

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 7 月 17 日 (17.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/057905 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12Q 1/32, G01N 21/78, 31/22, 33/52  
(21) 国際出願番号: PCT/JP03/00027  
(22) 国際出願日: 2003 年 1 月 6 日 (06.01.2003)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願 2001-400380  
2001 年 12 月 28 日 (28.12.2001) JP

(72) 発明者; および

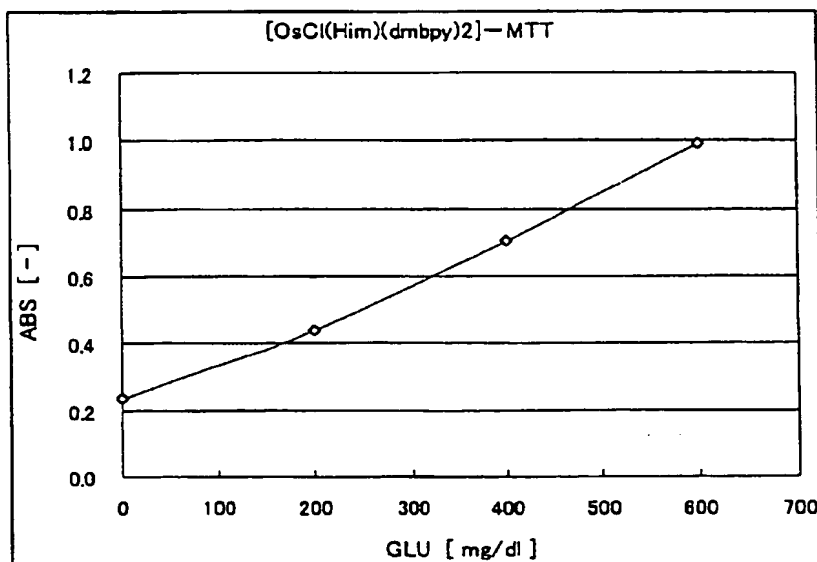
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 永川 健児 (NAGAKAWA, Kenji) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田町 57 番地 アークレイ株式会社 内 Kyoto (JP). 辻本 朋吾 (TSUJIMOTO, Tomomichi) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田町 57 番地 アークレイ株式会社 内 Kyoto (JP). 西野 進 (NISHINO, Susumu) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田町 57 番地 アークレイ株式会社 内 Kyoto (JP). 寺元 正明 (TERAMOTO, Masaaki) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田町 57 番地 アークレイ株式会社 内 Kyoto (JP). 川瀬 喜幸 (KAWASE, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田町 57 番地 アークレイ株式会社 内 Kyoto (JP).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田町 57 番地 Kyoto (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF COLORIMETRY AND REAGENT FOR USE THEREIN

(54) 発明の名称: 比色分析方法およびそれに用いる試薬



(57) Abstract: A method of colorimetry by which reliable analysis can be easily performed in a short time. Electrons are transferred, by the action of an oxidoreductase, from an analysis sample through a mediator to a color former which develops a color upon reduction. The color which is thus developed by the color former is measured to thereby qualitatively or quantitatively analyze the sample. The enzymatic reaction in this colorimetric method is a one-stage reaction, and the color-developing reaction occurs through a mediator. The measurement can hence be made in a short time. The found value is highly reliable because this reaction needs neither hydrogen peroxide nor oxygen.

[続葉有]



(74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒530-6026 大阪府 大阪市 北区天満橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

(57) 要約:

短時間かつ簡単に信頼性ある分析が実施できる比色分析方法を提供する。

酸化還元酵素により、分析対象物から、メディエータを介して、還元により発色する発色剤に電子を伝達し、その結果生じる前記発色剤の発色を測定することにより、前記分析対象物の定性若しくは定量を行う。この比色分析方法の酵素反応は、1段階の反応であり、メディエータを介して発色反応を起こすため、短時間で測定可能である。また、この反応は、過酸化水素および酸素を必要としないため、測定値の信頼性も高い。

## 明細書

### 比色分析方法およびそれに用いる試薬

#### 技術分野

本発明は、比色分析方法およびそれに使用する試薬に関する。

5

#### 背景技術

臨床検査や生化学検査等の分野において、グルコース、コレステロール等の成分分析が行われており、その一手法として、比色分析がある。例えば、グルコースの比色分析では、まずグルコースオキシダーゼをグル  
10 ルコース（基質）に作用させて、グルコノラクトンおよび過酸化水素を発生させ、過酸化水素を、ペルオキシダーゼの存在下、トリンダー試薬等の発色剤により検出するのが一般的である。このように、過酸化水素を介して間接的に基質濃度を測定するという手法は、グルコースに限らず、コレステロール等の他の成分分析にも適用されている。

15

しかし、従来の比色分析では、つぎのような問題がある。まず、分析対象物を直接測定するのではなく、過酸化水素を介して、間接的に測定するため、測定に時間がかかり、例えば、グルコースの測定の場合、30～60秒かかる。また、従来の比色分析法では、2種類の酵素反応系  
20 を同時に安定化する必要があり、条件設定が難しい。そして、酸素を必要とするため、従来の比色分析法では、酸素が不十分であると、反応が十分におこらないという問題もある。

#### 発明の開示

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、分析時間が短時間であり、かつ分析値に信頼性がある比色分析方法の提供を、その目的とする。

前記目的を達成するために、本発明の比色分析方法は、酸化還元酵素により、分析対象物から、メディエータを介して、還元により発色する発色剤に電子を伝達し、その結果生じる前記発色剤の発色を測定することにより、前記分析対象物の定性若しくは定量を行う方法であって、鉄錯体、ルテニウム錯体、オスミウム錯体および銅錯体からなる群から選択される少なくとも一つの錯体である。

10

この方法によれば、酵素反応は1段階の反応であるため、反応系が簡単で安定性が良くなる。また、酵素反応が1段階であるのと、前記発色剤の反応に前記メディエータを使用するため、酵素反応から発色反応までの時間が極めて短くなり、その結果、測定時間も短くなる。例えば、本発明の比色分析方法において、グルコースを基質とした場合、約5秒以内の短時間で測定可能である。また、本発明の比色分析方法では、発色までの反応が速いので、酵素を節約することができ、コスト的に有利である。そして、本発明の比色分析方法は、過酸化水素を介さないで発色剤を発色させ、かつ酸素を必要としないことから、分析値の信頼性も高い。

20

つぎに、本発明の試薬は、前記本発明の比色分析方法に使用される試薬であり、酸化還元酵素、メディエータおよび還元により発色する発色剤を含む試薬である。また、本発明の試験片は、前記本発明の試薬を含む試験片である。この試験片は、従来の過酸化水素を発生させる比色分析用の試験片に比べ、極めて短時間で分析が可能であり、その分析値の

25

信頼性も高い。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の一実施例におけるグルコース濃度と発色との関係を  
5 示すグラフである。

図 2 は、本発明のその他の実施例におけるグルコース濃度と発色との  
関係を示すグラフである。

図 3 は、本発明のさらにその他の実施例におけるグルコース濃度と発  
色との関係を示すグラフである。

10 図 4 は、本発明のさらにその他の実施例におけるグルコース濃度と発  
色との関係を示すグラフである。

図 5 は、本発明のさらにその他の実施例における発色剤の発色を示す  
グラフである。

図 6 A、図 6 B は、本発明のさらにその他の実施例における発色剤の  
15 発色を示すグラフである。

図 7 A、図 7 B は、本発明のさらにその他の実施例における発色剤の  
発色を示すグラフである。

図 8 は、本発明のさらにその他の実施例における発色剤の発色を示す  
グラフである。

20 図 9 は、本発明のさらにその他の実施例における発色剤の発色を示す  
グラフである。

図 10 は、本発明のさらにその他の実施例における発色剤の発色を示  
すグラフである。

図 11 は、本発明のさらにその他の実施例における発色剤の発色を示  
25 すグラフである。

図 12 は、本発明のさらにその他の実施例における発色剤の発色を示

すグラフである。

図 1 3 は、本発明のさらにその他の実施例における発色剤の発色を示すグラフである。

図 1 4 A、図 1 4 B は、本発明のさらにその他の実施例における発色  
5 剤の発色を示すグラフである。

図 1 5 は、本発明のさらにその他の実施例における発色剤の発色を示すグラフである。

図 1 6 A、図 1 6 B は、本発明のさらにその他の実施例における発色  
剤の発色を示すグラフである。

10

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の比色分析方法、試薬および試験片において、前述のように、前記メディエータは、鉄錯体、ルテニウム錯体、オスミウム錯体若しくは銅錯体またはこれらの 2 種類以上の混合物が好ましい。また、前記錯  
15 体の配位子の配位原子は、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される少なくとも一つであることが好ましい。前記配位子としては、例えば、アンモニア、ピリジル化合物、イミダゾール化合物、フェナントロリン化合物、エチレンジアミン化合物、アミノ酸、トリアジン化合物、  
20 ビキノリン化合物、ピリジルアゾ化合物、ニトロソ化合物、オキシニ化合物、ベンゾチアゾール化合物、アセチルアセトン化合物、アントラキノン化合物、キサンテン化合物、シュウ酸および前記各化合物の誘導体  
からなる群から選択される少なくとも一つであることが好ましい。また、前記錯体は、配位子を 2 種類以上有していてもよく、すなわち、混合配  
25 位子でもよい。前記配位子の配位座以外における水素原子の少なくとも一つは、置換基により置換された配位子であってもよい。前記置換基としては、例えば、アルキル基、アリール基、アリル基、フェニル基、ヒ

ドロキシシル基、アルコキシ基、カルボキシ基、カルボニル基、スルホン基、スルホニル基、ニトロ基、ニトロソ基、1級アミン、2級アミン、3級アミン、アミノ基、アシル基、アミド基およびハロゲン基がある。

- 5 本発明の比色分析方法、試薬および試験片において、酸化還元酵素は、脱水素酵素若しくは酸化酵素が好ましい。また、分析対象物は、例えば、グルコース、コレステロール、乳酸、尿酸、ビルビン酸、クレアチン、クレアチニンが好ましく、この場合の好ましい酸化還元酵素は、前記各物質に対応する脱水素酵素若しくは酸化酵素である。酵素量を多くすれば、反応が速くなるので好ましい。前記発色剤は、テトラゾリウム塩が好ましい。前記テトラゾリウム塩は、ニトロフェニル基、チアゾリル基およびベンゾチアゾリル基の少なくとも一つの基を有することが好ましい。前記テトラゾリウム塩の具体例としては、例えば、MTT、INT、Neo-TB、Nitro-TB、TB、WST-1、WST-3、WST-4、  
10 WST-5、WST-8、2-(2-Benzothiazolyl)-3,5-diphenyltetrazolium Bromide、2-(2-Benzothiazolyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium Bromide、2,3-Bis(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium Chloride、2,3-Di(4-nitrophenyl)tetrazolium Perchlorate、3-(3-Nitrophenyl)-5-methyl-  
15 2-phenyltetrazolium Chloride、および、3-(4-Nitrophenyl)-5-methyl-2-phenyltetrazolium Chlorideがある。

- 本発明の試験片において、前記試薬に加え、さらに無機ゲルを含むことが好ましい。無機ゲルにより酸素を遮断すれば、発色剤の酸化を防止  
25 でき、また再酸化による発色後の退色も防止できる。

前述のように、本発明において、前記メディエータは、鉄錯体、ルテニウム錯体、オスミウム錯体、銅錯体が好ましく、特に好ましくはオスミウム錯体である。

5 (鉄錯体)

鉄錯体の配位子としては、例えば、アンモニア、ピピリジル化合物、イミダゾール化合物、フェナントロリン化合物、エチレンジアミン化合物、アミノ酸、トリアジン化合物、ピキノリン化合物、ピリジルアゾ化合物、ニトロソ化合物、オキシシン化合物、ベンゾチアゾール化合物、アセチルアセトン化合物、アントラキノン化合物、キサンテン化合物、シ  
10 ュウ酸および前記各化合物の誘導体等の配位子があげられる。これらを2種類以上組み合わせて混合配位子としてもよい。

ピピリジルの場合、配位数は、6である。ピピリジルは、置換してなくとも良いし、置換基を導入してもよい。置換基を導入することにより、  
15 例えば、溶解度や酸化還元電位等を調整することが可能となる。置換位置としては、4、4'位および5、5'位がある。置換基は、例えば、アルキル基（例えば、メチル基、エチル基、プロピル基等）、アリール基、アリル基、フェニル基、ヒドロキシル基、アルコキシ基（例えば、  
20 メトキシ基、エトキシ基等）、カルボキシ基、カルボニル基、スルホン基、スルホニル基、ニトロ基、ニトロソ基、1級アミン、2級アミン、3級アミン、アミノ基、アシル基、アミド基およびハロゲン基（例えば、臭素、塩素、ヨウ素等）がある。

25 ピピリジル鉄錯体の例としては、例えば、 $[\text{Fe}(\text{bipyridyl})_3]$ 、 $[\text{Fe}(4,4' - \text{dimethyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$ 、 $[\text{Fe}(4,4' - \text{diphenyl}-2,2' -$



bipyridyl)<sub>3</sub>] , [Fe(4,4' - diamino-2,2'-bipyridyl)<sub>3</sub>] , [Fe(4,4' - dihydroxy-2,2'-bipyridyl)<sub>3</sub>] , [Fe(4,4' - dicarboxy-2,2'-bipyridyl)<sub>3</sub>] , [Fe(4,4' - dibromo-2,2'-bipyridyl)<sub>3</sub>] , [Fe(5,5' - dimethyl-2,2'-bipyridyl)<sub>3</sub>] , [Fe(5,5' - diphenyl-2,2'-bipyridyl)<sub>3</sub>] , [Fe(5,5' - diamino-2,2'-bipyridyl)<sub>3</sub>] , [Fe(5,5' - dihydroxy-2,2'-bipyridyl)<sub>3</sub>] , [Fe(5,5' - dicarboxy-2,2'-bipyridyl)<sub>3</sub>] , [Fe(5,5' - dibromo-2,2'-bipyridyl)<sub>3</sub>] などがある。

イミダゾールの場合、配位数は、6である。イミダゾールは、置換してなくても良いし、置換基を導入してもよい。置換基を導入することにより、例えば、溶解度や酸化還元電位等を調整することが可能となる。置換位置としては、2位、4位および5位がある。置換基は、例えば、アルキル基（例えば、メチル基、エチル基、プロピル基等）、アリール基、アリル基、フェニル基、ヒドロキシル基、アルコキシ基（例えば、メトキシ基、エトキシ基等）、カルボキシ基、カルボニル基、スルホン基、スルホニル基、ニトロ基、ニトロソ基、1級アミン、2級アミン、3級アミン、アミノ基、アシル基、アミド基およびハロゲン基（例えば、臭素、塩素、ヨウ素等）がある。

イミダゾール鉄錯体の例としては、例えば、[Fe(imidazole)<sub>6</sub>] , [Fe(4-methyl-imidazole)<sub>6</sub>] , [Fe(4-phenyl-imidazole)<sub>6</sub>] , [Fe(4-amino-imidazole)<sub>6</sub>] , [Fe(4-hydroxy-imidazole)<sub>6</sub>] , [Fe(4-carboxy-imidazole)<sub>6</sub>] , [Fe(4-bromo-imidazole)<sub>6</sub>] などがある。

25

アミノ酸としては、例えば、アルギニン (L-Arg) がある。アル

ギニン鉄錯体は、溶解性が高いという利点を一般的に持つ。また、混合配位子として、例えば、ビピリジルとイミダゾールの組み合わせ、ビピリジルとアミノ酸の組み合わせがある。例えば、 $[\text{Fe}(\text{imidazole})_2(\text{bipyridyl})_2]$ 、 $[\text{Fe}(\text{L-Arg})_2(\text{bipyridyl})_2]$  がある。混合配位子を用いると錯体に様々な性質を付与でき、例えば、アルギニンを用いると錯体の溶解性が向上する。

#### (ルテニウム錯体)

ルテニウム錯体の配位子としては、例えば、アンモニア、ビピリジル化合物、イミダゾール化合物、フェナントロリン化合物、エチレンジアミン化合物、アミノ酸、トリアジン化合物、ピキノリン化合物、ピリジルアゾ化合物、ニトロソ化合物、オキシシン化合物、ベンゾチアゾール化合物、アセチルアセトン化合物、アントラキノン化合物、キサントゲン化合物、シュウ酸および前記各化合物の誘導体等の配位子があげられる。

これらを2種類以上組み合わせて混合配位子としてもよい。

ビピリジルの場合、配位数は、6である。ビピリジルは、置換してなくても良いし、置換基を導入してもよい。置換基を導入することにより、例えば、溶解度や酸化還元電位等を調整することが可能となる。置換位置としては、4、4'位および5、5'位がある。置換基は、例えば、アルキル基（例えば、メチル基、エチル基、プロピル基等）、アリール基、アシル基、フェニル基、ヒドロキシ基、アルコキシ基（例えば、メトキシ基、エトキシ基等）、カルボキシ基、カルボニル基、スルホン基、スルホニル基、ニトロ基、ニトロソ基、1級アミン、2級アミン、3級アミン、アミノ基、アシル基、アミド基およびハロゲン基（例えば、臭素、塩素、ヨウ素等）がある。

ビピリジルルテニウム錯体の例としては、例えば、 $[\text{Ru}(\text{bipyridyl})_3]$ 、 $[\text{Ru}(4,4' - \text{dimethyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$ 、 $[\text{Ru}(4,4' - \text{diphenyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$ 、 $[\text{Ru}(4,4' - \text{diamino}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$ 、  
5  $[\text{Ru}(4,4' - \text{dihydroxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$ 、 $[\text{Ru}(4,4' - \text{dicarboxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$ 、 $[\text{Ru}(4,4' - \text{dibromo}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$ 、  
 $[\text{Ru}(5,5' - \text{dimethyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$ 、 $[\text{Ru}(5,5' - \text{diphenyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$ 、 $[\text{Ru}(5,5' - \text{diamino}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$ 、 $[\text{Ru}(5,5' - \text{dihydroxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$ 、  
10  $[\text{Ru}(5,5' - \text{dicarboxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$ 、 $[\text{Ru}(5,5' - \text{dibromo}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  等がある。

イミダゾールの場合、配位数は、6である。イミダゾールは、置換してなくても良いし、置換基を導入してもよい。置換基を導入することにより、例えば、溶解度や酸化還元電位等を調整することが可能となる。  
15 置換位置としては、2位、4位および5位がある。置換基は、例えば、アルキル基（例えば、メチル基、エチル基、プロピル基等）、アリール基、アリル基、フェニル基、ヒドロキシ基、アルコキシ基（例えば、メトキシ基、エトキシ基等）、カルボキシ基、カルボニル基、スルホン基、スルホニル基、ニトロ基、ニトロソ基、1級アミン、2級アミン、  
20 3級アミン、アミノ基、アシル基、アミド基およびハロゲン基（例えば、臭素、塩素、ヨウ素等）がある。

イミダゾールルテニウム錯体の例としては、例えば、 $[\text{Ru}(\text{imidazole})_6]$ 、 $[\text{Ru}(4\text{-methyl-imidazole})_6]$ 、 $[\text{Ru}(4\text{-phenyl-imidazole})_6]$ 、  
25  $[\text{Ru}(4\text{-amino-imidazole})_6]$ 、 $[\text{Ru}(4\text{-hydroxy-imidazole})_6]$ 、 $[\text{Ru}(4\text{-carboxy-imidazole})_6]$ 、 $[\text{Ru}(4\text{-bromo-}$

imidazole)<sub>6</sub>] 等がある。

アミノ酸としては、例えば、アルギニン (L-Arg) がある。アルギニルテニウム錯体は、溶解性が高いという利点を持つ。また、混合配位子として、例えば、ビピリジルとイミダゾールの組み合わせ、ビピリジルとアミノ酸の組み合わせがある。例えば、 $[\text{Ru}(\text{imidazole})_2(\text{bipyridyl})_2]$ ,  $[\text{Ru}(\text{L-Arg})_2(\text{bipyridyl})_2]$  がある。混合配位子を用いると錯体に様々な性質を付与でき、例えば、アルギニンを用いると錯体の溶解性が向上する。

10

(オスミウム錯体)

オスミウム錯体の配位子としては、例えば、アンモニア、ビピリジル化合物、イミダゾール化合物、フェナントロリン化合物、エチレンジアミン化合物、アミノ酸、トリアジン化合物、ピキノリン化合物、ピリジルアゾ化合物、ニトロソ化合物、オキシシン化合物、ベンゾチアゾール化合物、アセチルアセトン化合物、アントラキノン化合物、キサントゲン化合物、シュウ酸および前記各化合物の誘導体等の配位子があげられる。これらを二種類以上組み合わせて混合配位子としてもよい。

20 ビピリジルの場合、配位数は、6 である。ビピリジルは、置換してなくても良いし、置換基を導入してもよい。置換基を導入することにより、例えば、溶解度や酸化還元電位等を調整することが可能となる。置換位置としては、4、4' 位および 5、5' 位がある。置換基は、例えば、アルキル基 (例えば、メチル基、エチル基、プロピル基等)、アリール基、アリル基、フェニル基、ヒドロキシル基、アルコキシ基 (例えば、メトキシ基、エトキシ基等)、カルボキシ基、カルボニル基、スルホン

25

基、スルホニル基、ニトロ基、ニトロソ基、1級アミン、2級アミン、3級アミン、アミノ基、アシル基、アミド基およびハロゲン基（例えば、臭素、塩素、ヨウ素等）がある。

5      ビピリジルオスミウム錯体の例としては、例えば、 $[\text{Os}(\text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Os}(4,4' - \text{dimethyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Os}(4,4' - \text{diphenyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Os}(4,4' - \text{diamino}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Os}(4,4' - \text{dihydroxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Os}(4,4' - \text{dicarboxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Os}(4,4' - \text{dibromo}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  
10       $[\text{Os}(5,5' - \text{dimethyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Os}(5,5' - \text{diphenyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Os}(5,5' - \text{diamino}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Os}(5,5' - \text{dihydroxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Os}(5,5' - \text{dicarboxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Os}(5,5' - \text{dibromo}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  等がある。

15      イミダゾールの場合、配位数は、6である。イミダゾールは、置換してなくても良いし、置換基を導入してもよい。置換基を導入することにより、例えば、溶解度や酸化還元電位等を調整することが可能となる。置換位置としては、2位、4位および5位がある。置換基は、例えば、アルキル基（例えば、メチル基、エチル基、プロピル基等）、アリール  
20      基、アリル基、フェニル基、ヒドロキシ基、アルコキシ基（例えば、メトキシ基、エトキシ基等）、カルボキシ基、カルボニル基、スルホン基、スルホニル基、ニトロ基、ニトロソ基、1級アミン、2級アミン、3級アミン、アミノ基、アシル基、アミド基およびハロゲン基（例えば、臭素、塩素、ヨウ素等）がある。

25

イミダゾールオスミウム錯体の例としては、例えば、

[Os(imidazole)<sub>6</sub>] , [Os(4-methyl-imidazole)<sub>6</sub>] , [Os(4-phenyl-imidazole)<sub>6</sub>] , [Os(4-amino-imidazole)<sub>6</sub>] , [Os(4-hydroxy-imidazole)<sub>6</sub>] , [Os(4-carboxy-imidazole)<sub>6</sub>] , [Os(4-bromo-imidazole)<sub>6</sub>] 等がある。

5

アミノ酸としては、例えば、アルギニン (L-Arg) がある。アルギニンオスミウム錯体は、溶解性が高いという利点を持つ。また、混合配位子として、例えば、ビピリジルとイミダゾールの組み合わせ、ビピリジルとアミノ酸の組み合わせがある。例えば、[Os(imidazole)<sub>2</sub>(bipyridyl)<sub>2</sub>]、[Os(L-Arg)<sub>2</sub>(bipyridyl)<sub>2</sub>] がある。混合配位子を用いると錯体に様々な性質を付与でき、例えば、アルギニンを用いると錯体の溶解性が向上する。

10

#### (銅錯体)

銅錯体の配位子としては、例えば、アンモニア、ビピリジル化合物、イミダゾール化合物、フェナントロリン化合物、エチレンジアミン化合物、アミノ酸、トリアジン化合物、ピキノリン化合物、ピリジルアゾ化合物、ニトロソ化合物、オキシシン化合物、ベンゾチアゾール化合物、アセチルアセトン化合物、アントラキノン化合物、キサントゲン化合物、シュウ酸および前記各化合物の誘導体等の配位子があげられる。これらを二種類以上組み合わせて混合配位子としてもよい。

20

ビピリジルの場合、配位数は、4 若しくは 6 であるが、安定性の見地から、ビピリジルは 2 個配位させることが好ましい。ビピリジルは、置換してなくても良いし、置換基を導入してもよい。置換基を導入することにより、例えば、溶解度や酸化還元電位等を調整することが可能とな

25

る。置換位置としては、4、4'位および5、5'位がある。置換基は、例えば、アルキル基（例えば、メチル基、エチル基、プロピル基等）、アリール基、ア릴基、フェニル基、ヒドロキシル基、アルコキシ基（例えば、メトキシ基、エトキシ基等）、カルボキシ基、カルボニル基、スルホン基、スルホニル基、ニトロ基、ニトロソ基、1級アミン、2級アミン、3級アミン、アミノ基、アシル基、アミド基およびハロゲン基（例えば、臭素、塩素、ヨウ素等）がある。

ビピリジル銅錯体の例としては、例えば、 $[\text{Cu}(\text{bipyridyl})_2]$  ,  
10  $[\text{Cu}(4,4' - \text{dimethyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_2]$  ,  $[\text{Cu}(4,4' - \text{diphenyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_2]$  ,  $[\text{Cu}(4,4' - \text{diamino}-2,2' - \text{bipyridyl})_2]$  ,  $[\text{Cu}(4,4' - \text{dihydroxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_2]$  ,  $[\text{Cu}(4,4' - \text{dicarboxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_2]$  ,  $[\text{Cu}(4,4' - \text{dibromo}-2,2' - \text{bipyridyl})_2]$  ,  $[\text{Cu}(5,5' - \text{dimethyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_2]$  ,  $[\text{Cu}(5,5' - \text{diphenyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_2]$  ,  
15  $[\text{Cu}(5,5' - \text{diamino}-2,2' - \text{bipyridyl})_2]$  ,  $[\text{Cu}(5,5' - \text{dihydroxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_2]$  ,  $[\text{Cu}(5,5' - \text{dicarboxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_2]$  ,  $[\text{Cu}(5,5' - \text{dibromo}-2,2' - \text{bipyridyl})_2]$  ,  $[\text{Cu}(\text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Cu}(4,4' - \text{dimethyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Cu}(4,4' - \text{diphenyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Cu}(4,4' - \text{diamino}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Cu}(4,4' - \text{dihydroxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  
20  $[\text{Cu}(4,4' - \text{dicarboxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Cu}(4,4' - \text{dibromo}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Cu}(5,5' - \text{dimethyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Cu}(5,5' - \text{diphenyl}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Cu}(5,5' - \text{diamino}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Cu}(5,5' - \text{dihydroxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  $[\text{Cu}(5,5' - \text{dicarboxy}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  ,  
25  $[\text{Cu}(5,5' - \text{dibromo}-2,2' - \text{bipyridyl})_3]$  等がある。

イミダゾールの場合、配位数は、4である。イミダゾールは、置換してなくても良いし、置換基を導入してもよい。置換基を導入することにより、例えば、溶解度や酸化還元電位等を調整することが可能となる。置換位置としては、2位、4位および5位がある。置換基は、例えば、

5 アルキル基（例えば、メチル基、エチル基、プロピル基等）、アリール基、アリル基、フェニル基、ヒドロキシル基、アルコキシ基（例えば、メトキシ基、エトキシ基等）、カルボキシ基、カルボニル基、スルホン基、スルホニル基、ニトロ基、ニトロソ基、1級アミン、2級アミン、3級アミン、アミノ基、アシル基、アミド基およびハロゲン基（例えば、

10 臭素、塩素、ヨウ素等）がある。

イミダゾール銅錯体の例としては、例えば、 $[\text{Cu}(\text{imidazole})_4]$  ,  $[\text{Cu}(4\text{-methyl-imidazole})_4]$  ,  $[\text{Cu}(4\text{-phenyl-imidazole})_4]$  ,  $[\text{Cu}(4\text{-amino-imidazole})_4]$  ,  $[\text{Cu}(4\text{-hydroxy-imidazole})_4]$  ,

15  $[\text{Cu}(4\text{-carboxy-imidazole})_4]$  ,  $[\text{Cu}(4\text{-bromo-imidazole})_4]$  等がある。

アミノ酸としては、例えば、アルギニン（L-Arg）がある。アルギニン銅錯体は、溶解性が高いという利点を持つ。また、混合配位子として、例えば、ビピリジルとイミダゾールの組み合わせ、ビピリジルとアミノ酸の組み合わせがある。例えば、 $[\text{Cu}(\text{imidazole})_2(\text{bipyridyl})]$  ,  $[\text{Cu}(\text{L-Arg})_2(\text{bipyridyl})]$  がある。混合配位子を用いると銅錯体に様々な性質を付与でき、例えば、アルギニンを用いると錯体の溶解性が向上する。

20

25

以上の遷移金属錯体の説明は、遷移金属の種類に着目して例を挙げた



ものであり、本発明は、これらに限定されない。以下、遷移金属錯体について、配位子に着目して説明する。

- N, O, S の配位原子をもつ配位子とは、分子内に、例えば、=N-OH, -COOH, -OH, -SH, >C=O などの基を持っているものをいう。このような
- 5 配位子を持つ金属錯体としては、例えば、NNキレート、NOキレート、NSキレート、OOキレート、OSキレート、SSキレート(二座配位)、Nキレート(単座)、NNNキレート(三座)等があり、組み合わせは多種に及ぶ。配位子に二重結合を有しているものを選べば、Cu, Fe, Ru, Osの金属は電子伝達/授受機能がつきやすい。配位子としては、好ましくは芳香環を
- 10 有しているものが良い。前述のように、配位子に、様々な置換基を導入してもよい。例えば、スルホン基などを導入すれば、金属錯体の溶解度の上昇につながる。金属錯体を形成させる際に、配位子を二種以上混在させ、混合配位子錯体としても使用しても良い。例えば、配位子の一つとして、アミノ酸を混在させておけば酵素との親和性が良くなったりする
- 15 場合がある。また、中心金属の一部のサイトに各種ハロゲン(例えば、Cl, F, Br, I)を付けるなどしても良い。以下に、配位のタイプ別の分類した遷移金属錯体の一例を示す。

#### (NN配位型)

20

フェナントロリン誘導体

Cu + 1,10-Phenanthroline

Fe + 1,10-Phenanthroline

Cu + Bathophenanthroline

25 Fe + Bathophenanthroline

Cu + Bathophenanthroline sunlfonic acid

Fe + Bathophenanthroline sunlfonic acid

### ビピリジル誘導体

- Cu + 2,2'-Bipyridyl  
 Fe + 2,2'-Bipyridyl  
 Fe + 4,4'-Diamino-2,2'-bipyridyl  
 5 Ru + 4,4'-Diamino-2,2'-bipyridyl

### トリアジン誘導体

- Cu + TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-S-triazine)  
 Fe + TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-S-triazine)  
 10 Fe + PDTS (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-sulfophenyl)-1,2,4-triazine)

### ビキノリン誘導体

- Cu + Cuproin (2,2'-Biquinoline)  
 15

### ピリジルアゾ誘導体

- Fe + Nitro-PAPS (2-(5-Nitro-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl) amino] phenol)  
 20 (NO配位型)  
 Fe + Nitroso-PSAP (2-Nitroso-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl) amino] phenol)  
 Fe + Nitroso-ESAP (2-Nitroso-5-[N-ethyl-N-(3-sulfopropyl) amino] phenol)  
 25 Fe + 1-Nitroso-2-Naphthol

### (NS配位型)

- Fe + 2-Amino-4-thiazole acetic acid

(00配位型)

Fe + 1,2-Naphthoquinone-4-Sulfonic acid

(混合配位子型)

- 5 Os + Cl, Imidazole, 4,4'-Dimethyl-2,2'-Bipyridyl  
 Os + Imidazole, 4,4'-Dimethyl-2,2'-Bipyridyl  
 Cu + L-Arginine, 2,2'-Bipyridyl  
 Cu + Ethylenediamine, 2,2'-Bipyridyl  
 Cu + Imidazole, 2,2'-Bipyridyl

10

- つぎに、本発明において、前記発色剤は、特に制限されないが、2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride (INT)、3-(4,5,-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)、3,3'-(1,1'-Biphenyl-4,4'-diyl)-bis(2,5-diphenyl-2H-tetrazolium chloride) (Neo-TB)、3,3'-[3,3'-Dimethoxy-(1,1'-biphenyl)-4,4'-diyl]-bis[2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride] (Nitro-TB)、3,3'-[3,3'-Dimethoxy-(1,1'-biphenyl)-4,4'-diyl]-bis(2,5-diphenyl-2H-tetrazolium chloride) (TB)、2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-1)、2-(4-iodophenyl)-3-(2,4-dinitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-3)、2-Benzothiazoyl-3-(4-carboxy-2-methoxyphenyl)-5-[4-(2-sulfoethylcarbamoyl)phenyl]-2H-tetrazolium (WST-4) 2,2'-Dibenzothiazolyl-5,5'-bis[4-di(2-sulfoethyl)carbamoylphenyl]-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene)ditetrazolium, disodium
- 15
- 20
- 25

salt (W S T - 5) 、 2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (W S T - 8) 、 2-(2-Benzothiazolyl)-3,5-diphenyltetrazolium Bromide 、 2-(2-Benzothiazolyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium Bromide 、 2,3-Bis(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium Chloride 、 2,3-Di(4-nitrophenyl)tetrazolium Perchlorate 、 3-(3-Nitrophenyl)-5-methyl-2-phenyltetrazolium Chloride 、 3-(4-Nitrophenyl)-5-methyl-2-phenyltetrazolium Chloride、鉄錯体、銅錯体があげられる。なお、鉄錯体、銅錯体もメ  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65  
70  
75  
80  
85  
90  
95  
100  
105  
110  
115  
120  
125  
130  
135  
140  
145  
150  
155  
160  
165  
170  
175  
180  
185  
190  
195  
200  
205  
210  
215  
220  
225  
230  
235  
240  
245  
250  
255  
260  
265  
270  
275  
280  
285  
290  
295  
300  
305  
310  
315  
320  
325  
330  
335  
340  
345  
350  
355  
360  
365  
370  
375  
380  
385  
390  
395  
400  
405  
410  
415  
420  
425  
430  
435  
440  
445  
450  
455  
460  
465  
470  
475  
480  
485  
490  
495  
500  
505  
510  
515  
520  
525  
530  
535  
540  
545  
550  
555  
560  
565  
570  
575  
580  
585  
590  
595  
600  
605  
610  
615  
620  
625  
630  
635  
640  
645  
650  
655  
660  
665  
670  
675  
680  
685  
690  
695  
700  
705  
710  
715  
720  
725  
730  
735  
740  
745  
750  
755  
760  
765  
770  
775  
780  
785  
790  
795  
800  
805  
810  
815  
820  
825  
830  
835  
840  
845  
850  
855  
860  
865  
870  
875  
880  
885  
890  
895  
900  
905  
910  
915  
920  
925  
930  
935  
940  
945  
950  
955  
960  
965  
970  
975  
980  
985  
990  
995  
1000  
1005  
1010  
1015  
1020  
1025  
1030  
1035  
1040  
1045  
1050  
1055  
1060  
1065  
1070  
1075  
1080  
1085  
1090  
1095  
1100  
1105  
1110  
1115  
1120  
1125  
1130  
1135  
1140  
1145  
1150  
1155  
1160  
1165  
1170  
1175  
1180  
1185  
1190  
1195  
1200  
1205  
1210  
1215  
1220  
1225  
1230  
1235  
1240  
1245  
1250  
1255  
1260  
1265  
1270  
1275  
1280  
1285  
1290  
1295  
1300  
1305  
1310  
1315  
1320  
1325  
1330  
1335  
1340  
1345  
1350  
1355  
1360  
1365  
1370  
1375  
1380  
1385  
1390  
1395  
1400  
1405  
1410  
1415  
1420  
1425  
1430  
1435  
1440  
1445  
1450  
1455  
1460  
1465  
1470  
1475  
1480  
1485  
1490  
1495  
1500  
1505  
1510  
1515  
1520  
1525  
1530  
1535  
1540  
1545  
1550  
1555  
1560  
1565  
1570  
1575  
1580  
1585  
1590  
1595  
1600  
1605  
1610  
1615  
1620  
1625  
1630  
1635  
1640  
1645  
1650  
1655  
1660  
1665  
1670  
1675  
1680  
1685  
1690  
1695  
1700  
1705  
1710  
1715  
1720  
1725  
1730  
1735  
1740  
1745  
1750  
1755  
1760  
1765  
1770  
1775  
1780  
1785  
1790  
1795  
1800  
1805  
1810  
1815  
1820  
1825  
1830  
1835  
1840  
1845  
1850  
1855  
1860  
1865  
1870  
1875  
1880  
1885  
1890  
1895  
1900  
1905  
1910  
1915  
1920  
1925  
1930  
1935  
1940  
1945  
1950  
1955  
1960  
1965  
1970  
1975  
1980  
1985  
1990  
1995  
2000  
2005  
2010  
2015  
2020  
2025  
2030  
2035  
2040  
2045  
2050  
2055  
2060  
2065  
2070  
2075  
2080  
2085  
2090  
2095  
2100  
2105  
2110  
2115  
2120  
2125  
2130  
2135  
2140  
2145  
2150  
2155  
2160  
2165  
2170  
2175  
2180  
2185  
2190  
2195  
2200  
2205  
2210  
2215  
2220  
2225  
2230  
2235  
2240  
2245  
2250  
2255  
2260  
2265  
2270  
2275  
2280  
2285  
2290  
2295  
2300  
2305  
2310  
2315  
2320  
2325  
2330  
2335  
2340  
2345  
2350  
2355  
2360  
2365  
2370  
2375  
2380  
2385  
2390  
2395  
2400  
2405  
2410  
2415  
2420  
2425  
2430  
2435  
2440  
2445  
2450  
2455  
2460  
2465  
2470  
2475  
2480  
2485  
2490  
2495  
2500  
2505  
2510  
2515  
2520  
2525  
2530  
2535  
2540  
2545  
2550  
2555  
2560  
2565  
2570  
2575  
2580  
2585  
2590  
2595  
2600  
2605  
2610  
2615  
2620  
2625  
2630  
2635  
2640  
2645  
2650  
2655  
2660  
2665  
2670  
2675  
2680  
2685  
2690  
2695  
2700  
2705  
2710  
2715  
2720  
2725  
2730  
2735  
2740  
2745  
2750  
2755  
2760  
2765  
2770  
2775  
2780  
2785  
2790  
2795  
2800  
2805  
2810  
2815  
2820  
2825  
2830  
2835  
2840  
2845  
2850  
2855  
2860  
2865  
2870  
2875  
2880  
2885  
2890  
2895  
2900  
2905  
2910  
2915  
2920  
2925  
2930  
2935  
2940  
2945  
2950  
2955  
2960  
2965  
2970  
2975  
2980  
2985  
2990  
2995  
3000  
3005  
3010  
3015  
3020  
3025  
3030  
3035  
3040  
3045  
3050  
3055  
3060  
3065  
3070  
3075  
3080  
3085  
3090  
3095  
3100  
3105  
3110  
3115  
3120  
3125  
3130  
3135  
3140  
3145  
3150  
3155  
3160  
3165  
3170  
3175  
3180  
3185  
3190  
3195  
3200  
3205  
3210  
3215  
3220  
3225  
3230  
3235  
3240  
3245  
3250  
3255  
3260  
3265  
3270  
3275  
3280  
3285  
3290  
3295  
3300  
3305  
3310  
3315  
3320  
3325  
3330  
3335  
3340  
3345  
3350  
3355  
3360  
3365  
3370  
3375  
3380  
3385  
3390  
3395  
34

つぎに、本発明の比色分析方法を試験片に適用した例について、メ  
 20 イエータとしてオスミウム錯体を使用し、発色剤としてMTTを使用し、  
 かつグルコースを分析対象とした場合を例にとり説明する。なお、コレ  
 ステロール等のその他の成分分析は、それに応じて酸化還元酵素を変える  
 以外は、基本的に同様である。

25      まず、オスミウム錯体を準備する。これは、市販品を使用してもよいが、後述の実施例の方法で自家調製してもよい。オスミウム錯体は、バ

ッファー溶液に溶解し、これに、MTT、バインダー等の添加剤、グルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）を溶解して試薬液とする。バッファーとしては、リン酸バッファー、グッドのバッファー等がある。オスミウム錯体の濃度は、バッファー溶液全体に対し、例えば、1～10質量%である。バインダーとしては、例えば、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリアクリルアミド、牛血清アルブミン（BSA）等があり、このなかで、HPCが好ましい。また、バインダーの濃度は、例えば、0.5～5質量%の範囲である。GDHの濃度は、例えば、1000～5000U/mlである。MTTの濃度は特に制限されない。そして、前記試薬液をろ紙等の多孔質シートに含浸させ、その後乾燥させることにより、グルコース分析用の試験片が作成できる。なお、前記試薬液の含浸に先立ち、無機ゲル溶液を前記多孔質シートに含浸させ、乾燥させることが好ましい。無機ゲルとしては、例えば、スメクタイト等がある。前記無機ゲル溶液の無機ゲル濃度は、例えば、1～5質量%、好ましくは1～3質量%、より好ましくは1.5～2質量%である。前記無機ゲル溶液には、CHAPS等の両性界面活性剤を含有させてもよい。前記無機ゲル溶液全体に対する前記両性界面活性剤の濃度は、例えば、0.1～2質量%、好ましくは0.1～1質量%、より好ましくは0.2～0.4質量%である。前記無機ゲルの前記多孔質シートに対する含浸量は、多孔質シートの空隙体積基準で、例えば、1～50mg/cm<sup>3</sup>、好ましくは、10～30mg/cm<sup>3</sup>、15～20mg/cm<sup>3</sup>である。前記多孔質シートは、孔径が厚み方向若しくはシート面方向にしたいが変化する非対称多孔質膜でもよい。この試験片に、血液等のグルコースを含む試料を点着すると、その濃度に応じ、前記MTTが発色する。この発色の程度を測定することにより、グルコースの定性若しく

は定量分析が可能である。また、分析に必要な時間は、試料点着後、約 1～3 秒である。この試験片に無機ゲルが含浸させてあれば、より均一で安定な発色を得ることができる。

- 5 前記無機ゲルは、例えば、膨潤性粘土鉱物を使用することが好ましい。膨潤性粘土鉱物のうち、更に好ましいものはベントナイト、スメクタイト、バーミキュライトまたは合成フッ素雲母であり、特に好ましくは合成ヘクトライトもしくは合成サポナイト等の合成スメクタイト、または合成フッ素雲母で代表される膨潤性合成雲母（又はNa型雲母）等の合成雲母（天然の雲母は通常非膨潤性の粘土鉱物である）である。

- つぎに、本発明の比色分析方法を、液系分析に適用した例を、メディエータとしてオスミウム錯体を使用し、発色剤としてMTTを使用し、かつグルコースを分析対象とした場合を例にとり説明する。なお、コレステロール等のその他の成分分析は、それに応じて酸化還元酵素を変える以外は、基本的に同様である。

- すなわち、オスミウム錯体、GDH、MTTおよびバッファー溶液に溶解して試薬液を調製する。なお、水に溶解してもよいが、緩衝液に溶解するのが好ましい。緩衝液のpHは、例えば、pH 6～8の範囲であり、好ましくはpH 6.5～7の範囲である。また、オスミウム錯体の濃度は、例えば、0.1～60 mMであり、好ましくは0.2～10 mMであり、より好ましくは0.3～0.6 mMである。GDHの濃度は、例えば、10～1000 U/mlであり、好ましくは、50～500 U/mlであり、より好ましくは、100～200 U/mlである。MTTの濃度は特に制限されない。この試薬液に血液等のグルコースを含む

検体を添加すると、例えば、5秒以内の短時間に、前記試薬液が、検体のグルコース濃度に応じ、発色する。この変化は目視で確認しても良いし、分光光度計等の光学系測定装置を用いて測定してもよい。前記検体の添加量は、前記試薬液 1 ml に対し、例えば、1～100  $\mu$  l の範囲  
 5 であり、好ましくは 3～10  $\mu$  l の範囲であり、より好ましくは 5～10  $\mu$  l の範囲である。

### 実施例

つぎに、本発明の実施例について説明する。なお、下記において、P  
 10 QQとはピロロキノリンキノンを示し、その他の試薬の詳細は以下のとおりである。

試薬	メーカー名	備考（正式名称等）
PQQGDH	東洋紡	PQQ-Glucose Dehydrogenase
GOD	Sigma	Glucose Oxidase TypeX-S
Pyruvate Oxidase	BoehringerMannheim	
MTT	同仁化学	3-(4,5,-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
WST-4	同仁化学	2-Benzothiazoyl-3-(4-carboxy-2-methoxyphenyl)-5-[4-(2-sulfoethylcarbamoyl)phenyl]-2H-tetrazolium
WST-5	同仁化学	2,2'-Dibenzothiazolyl-5,5'-bis[4-di(2-sulfoethyl)carbamoylphenyl]-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene)ditetrazolium, disodium salt
グルコース	和光純薬	D(+)-Glucose
ピルビン酸	和光純薬	Lithium Pyruvate Monohydrate

## (実施例 1)

まず、オスミウム錯体  $[\text{OsCl}(\text{Him})(\text{dmbpy})_2]$  を合成した。すなわち、まず、 $(\text{NH}_4)_2[\text{OsCl}_6]$  2.00g (4.56mmol) とジメチルピピリジル (dmbpy) 1.68g (9.11mmol) を窒素気流下、エチレングリコール (60ml) 中で1時間還流した。室温まで冷却した後、1 M 亜二チオン酸ナトリウム水溶液 (120ml) を30分かけて加え、氷浴中で30分間冷却した。得られた沈澱を減圧ろ過し、十分に水で洗浄した (500~1000ml 使用)。さらにジエチルエーテルで2度洗浄した後、減圧乾燥した。これにより

10  $[\text{OsCl}_2(\text{dmbpy})_2]$  を 1.5 ~ 1.7g 得た。得られた  $[\text{OsCl}_2(\text{dmbpy})_2]$  1.56g (2.60mmol) とイミダゾール (Him) 0.36g (5.2mmol) とを窒素気流下、水/メタノール混合溶媒 (50ml) 中で2時間還流した。室温まで冷却した後、飽和 NaCl 水溶液 (300ml) を加えた。得られた沈澱を減圧ろ過し、飽和 NaCl 水溶液で洗浄した後、減圧乾

15 燥し、 $[\text{OsCl}(\text{Him})(\text{dmbpy})_2]\text{Cl}_2$  を得た。得られた  $[\text{OsCl}(\text{Him})(\text{dmbpy})_2]\text{Cl}_2$  をできるだけ少量のアセトニトリル/メタノール (1:1 v/v) で溶かし、カラムクロマトグラフィー (吸着剤: 活性アルミナ, 展開溶媒: アセトニトリル/メタノール) で精製した。溶媒をエバポレートした後、少量のアセトンに溶かし、ジエチルエーテルで再沈澱

20 させた。得られた沈澱を減圧ろ過した後、減圧乾燥することにより、精製  $[\text{OsCl}(\text{Him})(\text{dmbpy})_2]\text{Cl}_2$  を得た。

前記オスミウム錯体を含む下記試薬液を調製した。光路長10mmのマイクロセル (材質・ポリメタクリレート) に、種々濃度のグルコース (GLU) 水溶液液 (濃度: 0, 200, 400, 600mg/100ml) を5 $\mu$ l 入れ、さら

25 に下記試薬液を1000 $\mu$ l 入れると同時に波長600nmで吸光度を測定した。



この結果を、図 1 のグラフに示す。図示のように、グルコース濃度に応じて、発色したことが分かる。また、反応は迅速に行われ、基質を消費し尽くすまでに実質 2 秒程度しかかからなかった。

5 (試薬液組成)

M T T (同仁化学社製)	0.5mM
$[OsCl(Him)(dmbpy)_2]Cl_2$	0.1mM
PIPES (pH7.0)	40mM
PQQGDH	200U/ml

10

(実施例 2)

前記オスミウム錯体を含む下記試薬液を調製した。光路長10mmのマイクセル(材質・ポリメタクリレート)に、種々濃度のグルコース (GLU) 水溶液液 (濃度: 0, 200, 400, 600mg/100ml) を5 $\mu$ l入れ、さらに下記試薬液を1000 $\mu$ l入れると同時に波長600nmで吸光度を測定した。この結果を、図 2 のグラフに示す。図示のように、グルコース濃度に応じて、発色したことが分かる。また、反応は迅速に行われ、基質を消費し尽くすまでに実質 1 秒程度しかかからなかった。

20 (試薬液組成)

W S T - 5 (同仁化学社製)	0.5mM
$[OsCl(Him)(dmbpy)_2]Cl_2$	0.1mM
PIPES (pH7.0)	40mM
PQQGDH	200U/ml

25

(実施例 3)

下記ルテニウム錯体を含む下記試薬液を調製した。光路長10mmのマイクロセル(材質・ポリメタクリレート)に、種々濃度のグルコース(GLU)水溶液液(濃度: 0, 200, 400, 600mg/100ml)を5 $\mu$ l入れ、さらに下記試薬液を1000 $\mu$ l入れると同時に波長600nmで吸光度を測定した。

- 5 この結果を、図3のグラフに示す。図示のように、グルコース濃度に応じて、発色したことが分かる。また、反応は迅速に行われ、基質を消費し尽くすまでに実質2秒程度しかかからなかった。

(試薬液組成)

10	W S T - 5 (同仁化学社製)	0.5mM
	[Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ]Cl <sub>3</sub> (Aldrich社製)	10mM
	PIPES (pH7.0)	40mM
	PQQGDH	200U/ml

15 (実施例4)

- CuCl<sub>2</sub>と2,2'-ビピリジル(bpy)をモル比1:2で約80℃の温浴中で混合し、[Cu(bpy)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>を合成し、さらに、この銅錯体を含む下記試薬液を調製した。光路長10mmのマイクロセル(材質・ポリメタクリレート)に、種々濃度のグルコース(GLU)水溶液液(濃度: 20 0, 200, 400, 600mg/100ml)を5 $\mu$ l入れ、さらに下記試薬液を1000 $\mu$ l入れると同時に波長600nmで吸光度を測定した。この結果を、図4のグラフに示す。図示のように、グルコース濃度に応じて、発色したことが分かる。また、反応は迅速に行われ、基質を消費し尽くすまでに実質2秒程度しかかからなかった。

## (試薬液組成)

W S T - 5 (同仁化学社製)	0.5mM
[Cu(bpy) <sub>2</sub> ] Cl <sub>2</sub>	1mM
PIPES (pH7.0)	40mM
5 PQQGDH	200U/ml

## (実施例 5)

種々の配位子を有する銅錯体を作製した。すなわち、塩化銅(II)と、以下の配位子をモル比 1 : 2 で混合、精製水で溶かし、約 80℃ の温浴中  
 10 で 10 分間インキュベートして配位させ、錯溶液を得た。

配位子	メーカー名	錯体
1,10-Phenanthroline	和光純薬	[Cu(1,10-Phenanthroline) <sub>2</sub> ]
Bathophenanthroline	和光純薬	[Cu(Bathophenanthroline) <sub>2</sub> ]
Bathophenanthroline Sulfonic Acid Disodium Salt	カラテスク	[Cu(Bathophenanthroline Sulfonic Acid) <sub>2</sub> ]
2,2'-Bipyridyl	和光純薬	[Cu(2,2'-Bipyridyl) <sub>2</sub> ]
TPTZ	同仁化学	[Cu(TPTZ) <sub>2</sub> ]
Cuproin	和光純薬	[Cu(Cuproin) <sub>2</sub> ]

## (実施例 6)

15 配位子として、以下に示す配位子とビピリジルを用い、銅の混合配位子錯体を作製した。すなわち、銅 : 以下の配位子 : ビピリジンをモル比 1 : 2 : 1 で混合し、精製水で溶かし、約 80℃ の温浴中で 10 分間インキュベートして配位させ、以下の配位子を得た。

配位子	メーカー名	錯体
L-Arginine	ナカライテスク	[Cu(L-Arg)(bpy)]
Ethylenediamine	ナカライテスク	[Cu(en)(bpy)]
Imidazole	和光純薬	[Cu(Him)(bpy)]

## (実施例 7)

種々の配位子を用いて鉄錯体を作製した。塩化鉄(III)と以下の配位子をモル比 1 : 3 で混合、精製水で溶かし、約 80℃ の温浴中で 10 分間インキュベートして配位させ、錯溶液を得た。

配位子	メーカー名	錯体
1,10-Phenanthroline	和光純薬	[Fe(1,10-Phenanthroline)3]
Bathophenanthroline	和光純薬	[Fe(Bathophenanthroline)3]
Bathophenanthroline Sulfonic Acid Disodium Salt	ナカライテスク	[Fe(Bathophenanthroline Sulfonic Acid)3]
2,2'-Bipyridyl	和光純薬	[Fe(2,2'-Bipyridyl)3]
4,4'-Diamino-2,2'-Bipyridyl	自社合成	[Fe(4,4'-Diamino-2,2'-Bipyridyl)3]
TPTZ	同仁化学	[Fe(TPTZ)3]
PDTS	同仁化学	[Fe(PDTS)3]
Nitro-PAPS	同仁化学	[Fe(Nitroso-PAPS)3]
Nitroso-ESAP	同仁化学	[Fe(Nitroso-ESAP)3]
1-Nitroso-2-Naphthol	関東化学	[Fe(1-Nitroso-2-Naphthol)3]
2-Amino-4-Thiazole acetic acid	Lancaster	[Fe(2-Amino-4-Thiazole acetic acid)3]
1,2-Naphthoquinone-4-Sulfonic acid	ナカライテスク	[Fe(1,2-Naphthoquinone-4-Sulfonic acid)3]
Nitro-PSAP	同仁化学	[Fe(Nitroso-PSAP)3]

## (実施例 8)

以下のようにして、2 種類のルテニウム錯体を作製した。

10 [Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]

まず、市販のルテニウム錯体 (Aldrich社 Hexaammineruthenium(III) chloride) を水溶して、 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]$  の錯溶液を得た。

$[\text{Ru}(4,4'\text{-Diamino-2,2'-bipyridyl})_3]$

5      <配位子>      11.8g(63.0mmol) の 2,2'-Bipyridil-N,N'-dioxide (Aldrich社製) を氷浴で冷やした濃硫酸120mlにゆっくり溶かし、反応液を100℃に加熱した。次に硝酸カリウム64.0g(630mmol)の100ml濃硫酸溶液をゆっくりと滴下し、その後1時間加熱攪拌した。反応後、溶液を室温まで放冷し、碎氷へ注ぎ、4,4'-Dinitro-2,2'-bipyridyl-N,N'-oxide の固体を濾過して得た。アルゴン気流下、4,4'-Dinitro-2,2'-  
10    bipyridyl-N,N'-oxide 7.0g(25mm)、10%パラジウム炭素6.0gをエタノール23mlに懸濁させた。この溶液にヒドラジーン水和物6.3g(126mmol)の47mlエタノール溶液を滴下し、8時間還流した。反応液を放冷後、濾過し、濾液を濃縮した。精製はシリカゲルカラムで行い、4,4'-Diamino-2,2'-bipyridyl を得た。

15      <合成>      50mLの2つ首フラスコにエチレングリコール(10mL)を入れ、DA-bpy(0.2g)、 $\text{RuCl}_3$ (0.1g)を順次、攪拌溶解させ、 $\text{N}_2$ 気流下で強攪拌しながらマントヒーターで加熱し、約4時間還流した。

20      <精製>       $\text{N}_2$ 気流下で攪拌・放冷した後100mLのナズ型フラスコに移し、反応液をアセトン(5mL) + ジエチルエーテル(20mL)で洗浄した。溶媒のエチレングリコールが十分に除かれるまで、反応液をアセトン(5mL) + ジエチルエーテル(20mL)で繰り返し洗浄した。十分に洗浄した目的物をエタノールで溶解させ、ジエチルエーテルを加えることによって目的物を沈殿させた。ジエチルエーテルで洗浄しながら濾別し、減圧乾燥させて、 $[\text{Ru}(4,4'\text{-Diamino-2,2'-bipyridyl})_3]$  の固体を得た。これを水溶して錯溶液を得た。

## (実施例 9)

以下のようにして、2種類のオスミウム錯体を作製した。

$[\text{OsCl}(\text{Him})(\text{dmbpy})_2]$

- 5 <合成>  $(\text{NH}_4)_2[\text{OsCl}_6]$  2.00g (4.56mmol、Aldrich) と 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridyl (dmbpy 和光純約薬) 1.68g (9.11mmol) を窒素気流下、エチレングリコール 60ml 中で 1h 還流した。室温まで冷却した後、1M 亜二チオン酸ナトリウム水溶液 120ml を 30min かけて加え、氷浴中で 30min 冷却した。得られた沈澱を減圧ろ過し、十分に水で洗浄した(500~1000ml使用)。さらにジエチルエーテルで2度洗浄した後、減圧乾燥した。これで  $[\text{OsCl}_2(\text{dmbpy})_2]$  を 1.5~1.7g 得る。得られた  $[\text{OsCl}_2(\text{dmbpy})_2]$  1.56g (2.60mmol) と Imidazole (Him) 0.36g (5.2mmol) を窒素気流下、水/メタノール混合溶媒 50ml 中で 2h 還流した。室温まで冷却した後、飽和 NaCl 水溶液 300ml を加えた。得られた沈澱を減圧ろ過し、飽和 NaCl 水溶液で洗浄した後、減圧乾燥し、
- 10  $[\text{OsCl}(\text{Him})(\text{dmbpy})_2]\text{Cl}_2$  を得た。

- <精製>  $[\text{OsCl}(\text{Him})(\text{dmbpy})_2]\text{Cl}_2$  をできるだけ少量のアセトニトリル/メタノール (1:1 v/v) で溶かし、カラムクロマトグラフィー(吸着剤: 活性アルミナ, 展開溶媒: アセトニトリル/メタノール) で精製した。溶媒をエバポレートした後、少量のアセトンに溶かし、ジエチルエーテルで再沈澱させた。得られた沈澱を減圧ろ過した後、減圧乾燥した。
- 20 これを水溶して錯溶液を得た。

$[\text{Os}(\text{Him})_2(\text{dmbpy})_2]$

- <合成>  $(\text{NH}_4)_2[\text{OsCl}_6]$  2.00g (4.56mmol) と dmbpy 1.68g (9.11mmol) を窒素気流下、エチレングリコール 60ml 中で 1h 還流した。室温まで冷却した後、1M 亜二チオン酸ナトリウム水溶液 120ml を
- 25

30min かけて加え、氷浴中で 30min 冷却した。得られた沈澱を減圧ろ過し、十分に水で洗浄した(500~1000ml使用)。さらにジエチルエーテルで2度洗浄した後、減圧乾燥した。これで  $[\text{OsCl}_2(\text{dmbpy})_2]$  を 1.5~1.7g 得る。得られた  $[\text{OsCl}_2(\text{dmbpy})_2]$  1.56g (2.60mmol) と Him 0.36g (5.2mmol) を窒素気流下、1,2-タンジオール溶媒 50ml 中で 2h 還流した。室温まで冷却した後、飽和NaCl水溶液 300ml を加えた。得られた沈澱を減圧ろ過し、飽和NaCl水溶液で洗浄した後、減圧乾燥し、 $[\text{Os}(\text{Him})_2(\text{dmbpy})_2]\text{Cl}_2$  を得た。

〈精製〉  $[\text{Os}(\text{Him})_2(\text{dmpyy})_2]\text{Cl}_2$  をできるだけ少量のアセトニトリル/メタノール (1:1 v/v) で溶かし、カラムクロマトグラフィー(吸着剤: 活性アルミナ, 展開溶媒: アセトニトリル/メタノール) で精製した。溶媒をエバポレートした後、少量のアセトンに溶かし、ジエチルエーテルで再沈澱させた。得られた沈澱を減圧ろ過した後、減圧乾燥した。これを水溶して錯溶液を得た。

#### (実施例 10)

以下に示す組成で、錯体・酵素・発色剤・緩衝液を混合して試薬液を調製した。なお、前記錯体は、前述の実施例で合成したものを使用した。以下の実施例も同様である。前記試薬液のスペクトル測定してブランクとし、さらに前記錯体に対し当量のGlucoseを添加し、色調変化後のスペクトルを測定した。この結果を図5に示す。図示のように、金属錯体が電子伝達剤として働いてWST-5を還元し、還元型WST-5特有のスペクトルを示した。

## (試薬液組成)

	PQQ-GDH	50	U/mL
	[Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ]	0.8	mM
	WST-5	0.2	mM
5	PIPES pH7	50	mM
	Triton X-100	0.5	%

## (実施例 1 1)

- 以下に示す組成で、錯体・酵素・発色剤・緩衝液を混合して試薬液を調製し、これをスペクトル測定し、ブランクとし、さらに前記錯体に対し当量のGlucoseを添加し、色調変化後のスペクトルを測定した。この結果を図 6 A、図 6 B に示す。図示のように、金属錯体が電子伝達剤として働いてMTTを還元し、還元型MTT特有のスペクトルを示した。

## (試薬液組成 1 : 図 6 A)

15	PQQ-GDH	50	U/mL
	[Cu(1,10-Phenanthroline) <sub>2</sub> ]	1	mM
	MTT	1	mM
	PIPES pH7	50	mM
	Triton X-100	0.5	%

## 20 (試薬液組成 2 : 図 6 B)

	PQQ-GDH	50	U/mL
	[Fe(Bathophenanthroline) <sub>3</sub> ]	1	mM
	MTT	1	mM
	PIPES pH7	50	mM
25	Triton X-100	0.5	%

(Bathophenanthroline=4,7-Diphenyl phenanthroline)



## (実施例 1 2)

以下に示す組成で、錯体・酵素・発色剤・緩衝液を混合して試薬液を調製し、これをスペクトル測定し、ブランクとし、さらに前記錯体に対し当量のGlucoseを添加し、色調変化後のスペクトルを測定した。この結果を図 7 A、図 7 Bに示す。図示のように、金属錯体が電子伝達剤として働いてMTTを還元し、還元型MTT特有のスペクトルを示した。

## (試薬液組成 1 : 図 7 A)

10	PQQ-GDH	50	U/mL
	[Fe(2,2'-Bipyridyl) <sub>3</sub> ]	1	mM
	MTT	1	mM
	PIPES pH7	50	mM
	Triton X-100	0.5	%

15

## (試薬液組成 2 : 図 7 B)

	PQQ-GDH	50	U/mL
	[Fe(4,4'-Diamino-2,2'-Bipyridyl) <sub>3</sub> ]	0.1	mM
	MTT	1	mM
20	PIPES pH7	50	mM
	Triton X-100	0.5	%

## (実施例 1 3)

以下に示す組成で、錯体・酵素・発色剤・緩衝液を混合して試薬液を調製し、これをスペクトル測定し、ブランクとし、さらに前記錯体に対し当量のGlucoseを添加し、色調変化後のスペクトルを測定した。この

結果を図 8 に示す。図示のように、金属錯体が電子伝達剤として働いて MTT を還元し、還元型 MTT 特有のスペクトルを示した。

(試薬液組成)

5	PQQ-GDH	50	U/mL
	[Fe(TPTZ) <sub>3</sub> ]	0.1	mM
	MTT	1	mM
	PIPES pH7	50	mM
	Triton X-100	0.5	%
10	(TPTZ=2,4,6-Tripyridyl-s-triazine)		

(実施例 14)

以下に示す組成で、錯体・酵素・発色剤・緩衝液を混合して試薬液を調製し、これをスペクトル測定し、ブランクとし、さらに前記錯体に対し当量の Glucose を添加し、色調変化後のスペクトルを測定した。この結果を図 9 に示す。図示のように、金属錯体が電子伝達剤として働いて MTT を還元し、還元型 MTT 特有のスペクトルを示した。

(試薬液組成)

20	PQQ-GDH	50	U/mL
	[Cu(Cuproin) <sub>2</sub> ]	1	mM
	MTT	1	mM
	PIPES pH7	50	mM
	Triton X-100	0.5	%
25	(Cuproin=2,2'-Biquinoline)		

## (実施例 15)

以下に示す組成で、錯体・酵素・発色剤・緩衝液を混合して試薬液を調製し、これをスペクトル測定し、ブランクとし、さらに前記錯体に対し当量のGlucoseを添加し、色調変化後のスペクトルを測定した。この結果を図10に示す。図示のように、金属錯体が電子伝達剤として働いてMTTを還元し、還元型MTT特有のスペクトルを示した。

## (試薬液組成)

PQQ-GDH	50	U/mL
[Fe(Nitro-PAPS) <sub>3</sub> ]	0.02	mM
10 MTT	1	mM
PIPES pH7	50	mM
Triton X-100	0.5	%

## (実施例 16)

以下に示す組成で、錯体・酵素・発色剤・緩衝液を混合して試薬液を調製し、これをスペクトル測定し、ブランクとし、さらに前記錯体に対し当量のGlucoseを添加し、色調変化後のスペクトルを測定した。この結果を図11に示す。図示のように、金属錯体が電子伝達剤として働いてMTTを還元し、還元型MTT特有のスペクトルを示した。

20

## (試薬液組成)

PQQ-GDH	50	U/mL
[Fe(1-Nitroso-2-Naphthol) <sub>3</sub> ]	0.1	mM
MTT	1	mM
25 PIPES pH7	50	mM
Triton X-100	0.5	%

## (実施例 17)

以下に示す組成で、錯体・酵素・発色剤・緩衝液を混合して試薬液を調製し、これをスペクトル測定し、ブランクとし、さらに前記錯体に対し当量のGlucoseを添加し、色調変化後のスペクトルを測定した。この結果を図 12 に示す。図示のように、金属錯体が電子伝達剤として働いてMTTを還元し、還元型MTT特有のスペクトルを示した。

## (試薬液組成)

PQQ-GDH	50	U/mL
10 [Fe(2-Amino-4-thiazoleacetic acid) <sub>3</sub> ]	1	mM
MTT	1	mM
PIPES pH7	50	mM
Triton X-100	0.5	%

## 15 (実施例 18)

以下に示す組成で、錯体・酵素・発色剤・緩衝液を混合して試薬液を調製し、これをスペクトル測定し、ブランクとし、さらに前記錯体に対し当量のGlucoseを添加し、色調変化後のスペクトルを測定した。この結果を図 13 に示す。図示のように、金属錯体が電子伝達剤として働いてMTTを還元し、還元型MTT特有のスペクトルを示した。

## (試薬液組成)

PQQ-GDH	50	U/mL
[Fe(1,2-Naphthoquinone-4-Sulfonic acid) <sub>3</sub> ]	1	mM
MTT	1	mM
25 PIPES pH7	50	mM
Triton X-100	0.5	%

## (実施例 19)

以下に示す組成 1, 2 で、錯体・酵素・発色剤・緩衝液を混合して試薬液を調製し、これをスペクトル測定し、ブランクとし、さらに前記錯体に対し当量のGlucoseを添加し、色調変化後のスペクトルを測定した。この結果を図 1 4 A に、図 1 4 B 示す。図示のように、金属錯体が電子伝達剤として働いてMTTを還元し、還元型MTT特有のスペクトルを示した。

## (試薬液組成 1 : 図 1 4 A)

10	PQQ-GDH	50	U/mL
	[OsCl(Him)(dmbpy) <sub>2</sub> ]	0.1	mM
	MTT	1	mM
	PIPES pH7	50	mM
	Triton X-100	0.5	%
15	(Him=Imidazole)		
	(dmbpy=4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridyl)		

## (試薬液組成 2 : 図 1 4 B)

	PQQ-GDH	50	U/mL
20	[Os(Him) <sub>2</sub> (dmbpy) <sub>2</sub> ]	0.1	mM
	MTT	1	mM
	PIPES pH7	50	mM
	Triton X-100	0.5	%
	(Him=Imidazole)		
25	(dmbpy=4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridyl)		

## (実施例 20)

以下に示す組成で、錯体・酵素（ピルビン酸オキシダーゼ）・発色剤・緩衝液を混合して試薬液を調製し、これをスペクトル測定し、ブランクとし、さらに前記錯体に対し当量のGlucoseを添加し、色調変化後のスペクトルを測定した。この結果を図15に示す。図示のように、金属錯体が電子伝達剤として働いてMTTを還元し、還元型MTT特有のスペクトルを示した。

## (試薬液組成)

	Pyruvate Oxidase	100	U/mL
10	[OsCl(Him)(dmbpy) <sub>2</sub> ]	0.1	mM
	MTT	1	mM
	PIPES pH7	50	mM
	Triton X-100	0.5	%

(Him=Imidazole)

15 (dmbpy=4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridyl)

## (実施例 21)

この実施例は、酵素量を増やすことにより、試薬の反応速度を向上させることができることを確認した実施例である。まず、2つのメッシュ繊維（10cm×10cm）に対し、以下の組成1、2の試薬液を1ml含浸して、熱風で乾燥させた。この繊維をポリエチレンテレフタレート（PET）フィルムに貼り付けて、所定形状に裁断し、酵素量が異なる2種類の試験片を作製した。この試験片に、試料として、血清ベースのグルコース標準液 0, 200, 400, 600mg/dl 点着し、反射率測定装置（LED/波長 660nm）により、30秒間のK/S変化を観察した。なお、前記血清ベースのグルコース標準液は、解糖しきったヒト全血の血漿を凍結融解し、得ら

れた血清に対して、グルコース溶液を添加して調製したものである。この結果を、図 1 6 A、図 1 6 B に示す。図示のように、酵素量が 5 0 0 0 U / m l の場合は、1 0 0 0 U / m l の場合に比べて反応速度が向上し、約 5 秒で反応が終局に達した。また、反応が終局に達したと思われる 5 秒付近のシグナルをサンプリングすれば、グルコース定量が可能であり、反応が終局に達するまでのタイムコース傾きからも、グルコース定量が可能であった。

(試薬液組成 1 : 図 1 6 A)

10	PQQ-GDH	1000	U/ml
	[OsCl(Him)(dmbpy) <sub>2</sub> ]	1	ml
	MMT	30	mM
	PIPES pH6.5	80	mM
	MEGA-8 (同仁化学社製)	1	%
15	Polyacrylamide	0.1	%
	BSA	1	%

(試薬液組成 2 : 図 1 6 B)

	PQQ-GDH	5000	U/ml
20	[OsCl(Him)(dmbpy) <sub>2</sub> ]	1	ml
	MMT	30	mM
	PIPES pH6.5	80	mM
	MEGA-8 (同仁化学社製)	1	%
	Polyacrylamide	0.1	%
25	BSA	1	%

#### 産業上の利用可能性

以上のように、本発明の比色分析方法によれば、短時間かつ簡単に信頼性のある分析を実施できる。



## 請求の範囲

1. 酸化還元酵素により、分析対象物から、メディエータを介して、還元により発色する発色剤に電子を伝達し、その結果生じる前記発色剤の発色を測定することにより、前記分析対象物の定性若しくは定量を行う比色分析方法であって、前記メディエータが、銅錯体、鉄錯体、オスミウム錯体およびルテニウム錯体からなる群から選択された少なくとも一つである比色分析方法。
2. 前記錯体の配位子の配位原子が、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択された少なくとも一つである請求項1記載の比色分析方法。
3. 前記錯体の配位子が、アンモニア、ピリジル化合物、イミダゾール化合物、フェナントロリン化合物、エチレンジアミン化合物、アミノ酸、トリアジン化合物、ピキノリン化合物、ピリジルアゾ化合物、ニトロソ化合物、オキシシン化合物、ベンゾチアゾール化合物、アセチルアセトン化合物、アントラキノン化合物、キサントゲン化合物、シュウ酸および前記各化合物の誘導体からなる群から選択される少なくとも一つである請求項1記載の比色分析方法。
4. 配位子の配位座以外における水素原子の少なくとも一つが、置換基により置換された配位子である請求項3記載の比色分析方法。
5. 置換基が、アルキル基、アリール基、アリル基、フェニル基、ヒドロキシル基、アルコキシ基、カルボキシ基、カルボニル基、スルホン基、スルホニル基、ニトロ基、ニトロソ基、1級アミン、2級アミン、

3級アミン、アミノ基、アシル基、アミド基およびハロゲン基からなる群から選択された少なくとも一つである請求項4記載の比色分析方法。

5

6. 錯体が、配位子を2種類以上有する請求項1記載の比色分析方法。

7. 酸化還元酵素が、脱水素酵素若しくは酸化酵素である請求項1記載の比色分析方法。

10

8. 発色剤が、テトラゾリウム塩である請求項1から7のいずれかに記載の比色分析方法。

15

10. テトラゾリウム塩が、MTT、INT、Neo-TB、Nitro-TB、TB、WST-1、WST-3、WST-4、WST-5、WST-8、2-(2-Benzothiazolyl)-3,5-diphenyltetrazolium Bromide、2-(2-Benzothiazolyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium Bromide、20 2,3-Bis(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium Chloride、2,3-Di(4-nitrophenyl)tetrazolium Perchlorate、3-(3-Nitrophenyl)-5-methyl-2-phenyltetrazolium Chloride、および、3-(4-Nitrophenyl)-5-methyl-2-phenyltetrazolium Chlorideからなる群から選択された少なくとも一つの発色剤である請求項8記載の比色分析方法。

25

11. 分析対象物が、グルコース、コレステロール、尿酸、ビルビン

酸、若しくは乳酸であり、酸化還元酵素が、前記各物質に対応する脱水素酵素若しくは酸化酵素である請求項 1 記載の比色分析方法。

1 2. 請求項 1 に記載の比色分析方法に使用する試薬であって、酸化還元酵素、メディエータおよび還元により発色する発色剤を含む試薬であって、前記メディエータが、銅錯体、鉄錯体、オスミウム錯体およびルテニウム錯体からなる群から選択された少なくとも一つである試薬。

1 3. 錯体の配位子の配位原子が、窒素、酸素および硫黄からなる群の少なくとも一つである請求項 1 2 記載の試薬。

1 4. 前記錯体の配位子が、アンモニア、ピピリジル化合物、イミダゾール化合物、フェナントロリン化合物、エチレンジアミン化合物、アミノ酸、トリアジン化合物、ピキノリン化合物、ピリジルアゾ化合物、ニトロソ化合物、オキシシン化合物、ベンゾチアゾール化合物、アセチルアセトン化合物、アントラキノン化合物、キサントゲン化合物、シュウ酸および前記各化合物の誘導体からなる群から選択される少なくとも一つである請求項 1 3 記載の試薬。

1 5. 配位子の配位座以外における水素原子の少なくとも一つが、置換基により置換された配位子である請求項 1 4 記載の試薬。

1 6. 置換基が、アルキル基、アリール基、アリル基、フェニル基、ヒドロキシル基、アルコキシ基、カルボキシ基、カルボニル基、スルホン基、スルホニル基、ニトロ基、ニトロソ基、1 級アミン、2 級アミン、3 級アミン、アミノ基、アシル基、アミド基およびハロゲン基からなる

群から選択された少なくとも一つである請求項 1 5 記載の試薬。

1 7. 錯体が、配位子を 2 種類以上有する請求項 1 2 記載の試薬。

5 1 8. 酸化還元酵素が、脱水素酵素若しくは酸化酵素を含む請求項 1 2 記載の試薬。

1 9. 発色剤が、テトラゾリウム塩である請求項 1 2 記載の試薬。

10 2 0. テトラゾリウム塩が、ニトロフェニル基、チアゾリル基およびベンゾチアゾリル基の少なくとも一つの基を有する請求項 1 9 記載の試薬。

2 1. テトラゾリウム塩が、MTT、INT、Neo-TB、Nitro-TB、  
15 TB、WST-1、WST-3、WST-4、WST-5、WST-8、  
2-(2-Benzothiazolyl)-3,5-diphenyltetrazolium Bromide、2-(2-Benzothiazolyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium Bromide、  
2,3-Bis(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium Chloride、2,3-Di(4-nitrophenyl)tetrazolium Perchlorate、3-(3-Nitrophenyl)-5-methyl-  
20 2-phenyltetrazolium Chloride、および、3-(4-Nitrophenyl)-5-methyl-2-phenyltetrazolium Chlorideからなる群から選択された少なくとも一つの発色剤である請求項 1 9 記載の試薬。

2 2. 分析対象物が、グルコース、コレステロール、尿酸、ピルビン  
25 酸、若しくは乳酸であり、酸化還元酵素が、前記各物質に対応する脱水素酵素若しくは酸化酵素である請求項 1 2 記載の試薬。

2 3. 請求項 1 2 記載の試薬を含む比色分析用の試験片。

2 4. さらに、無機ゲルを含む請求項 2 3 記載の試験片。

Fig.1

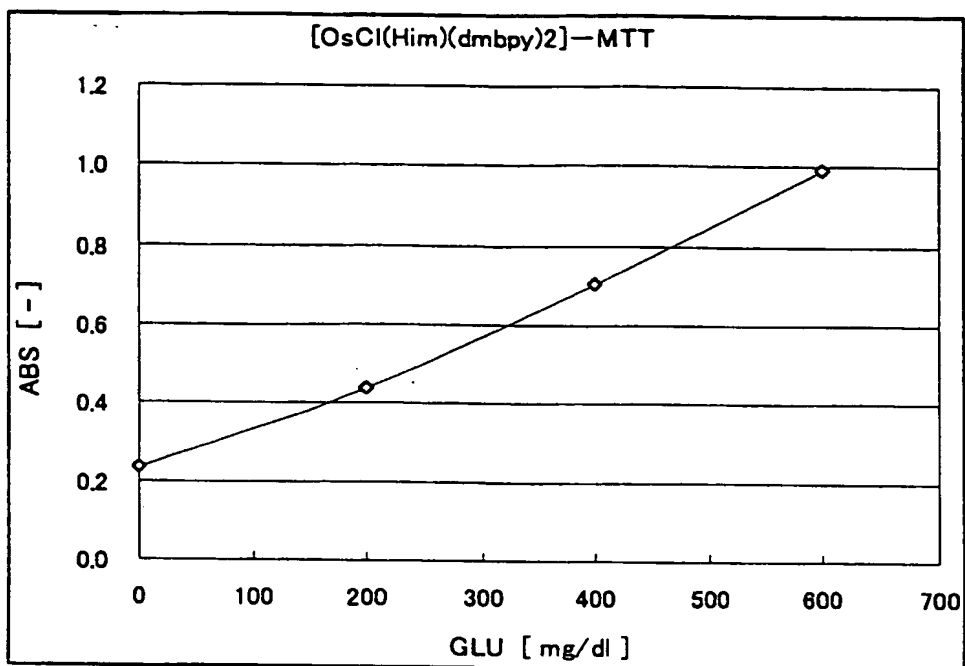


Fig.2

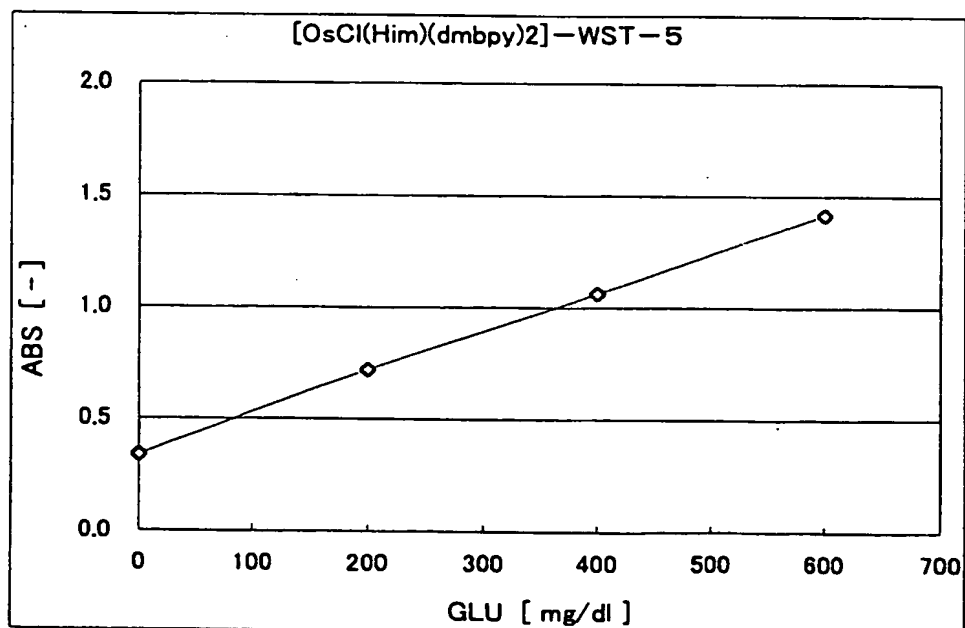


Fig.3

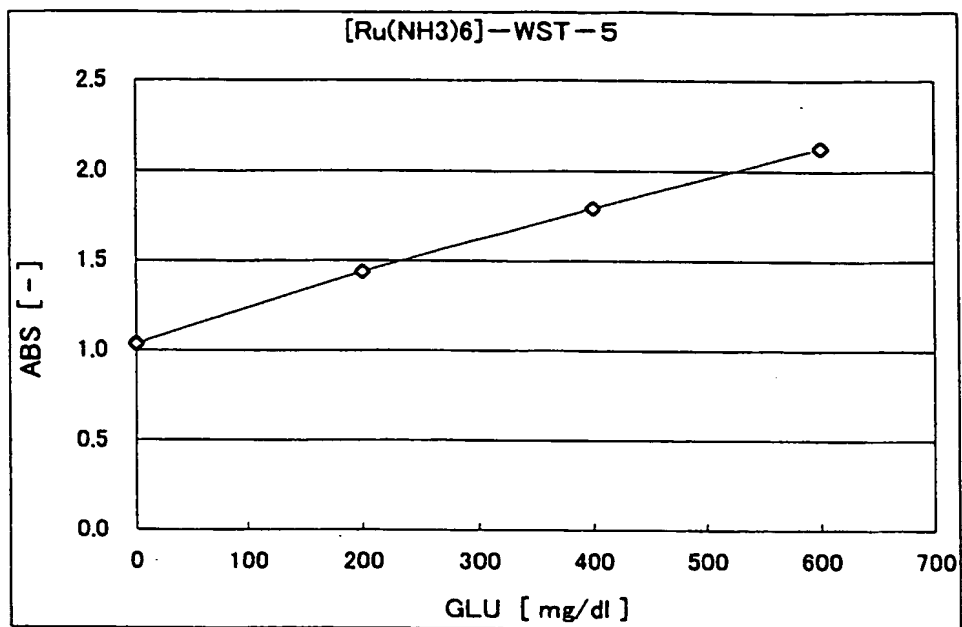


Fig.4

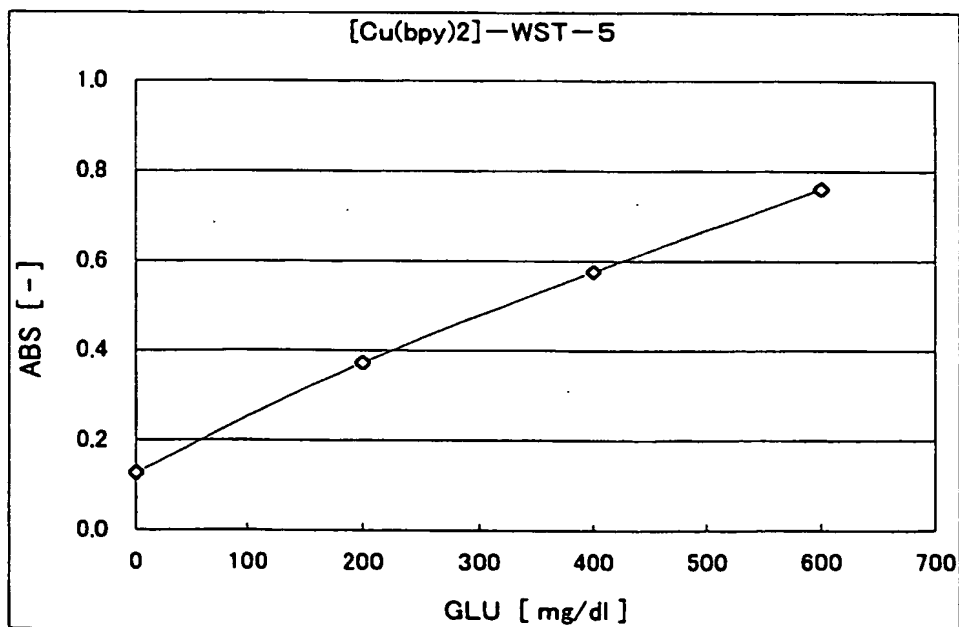


Fig.5

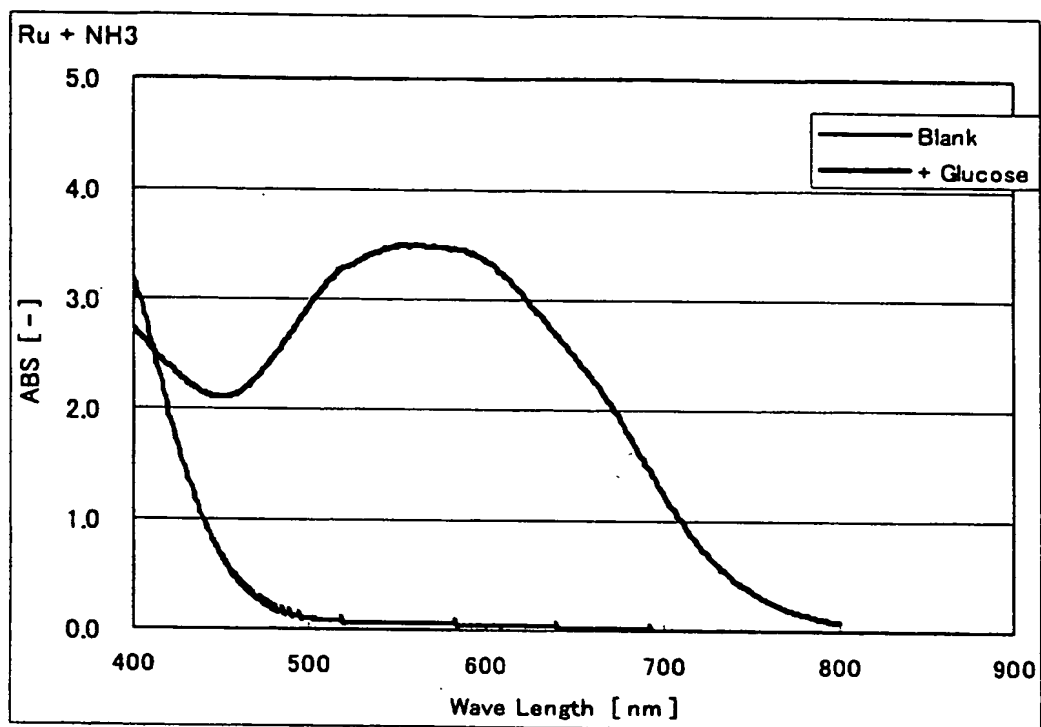




Fig.6A

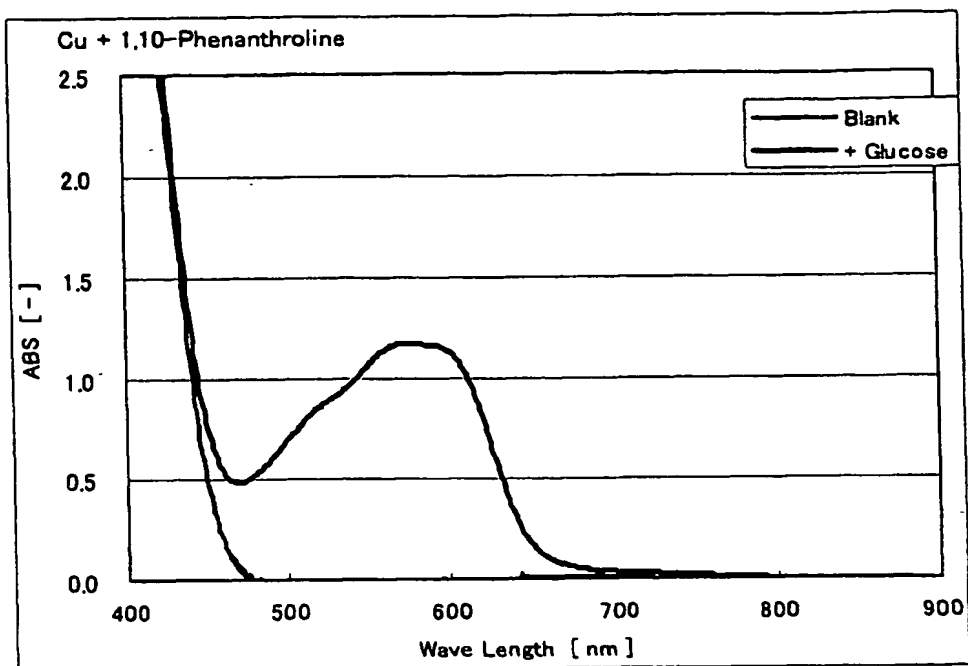


Fig.6B

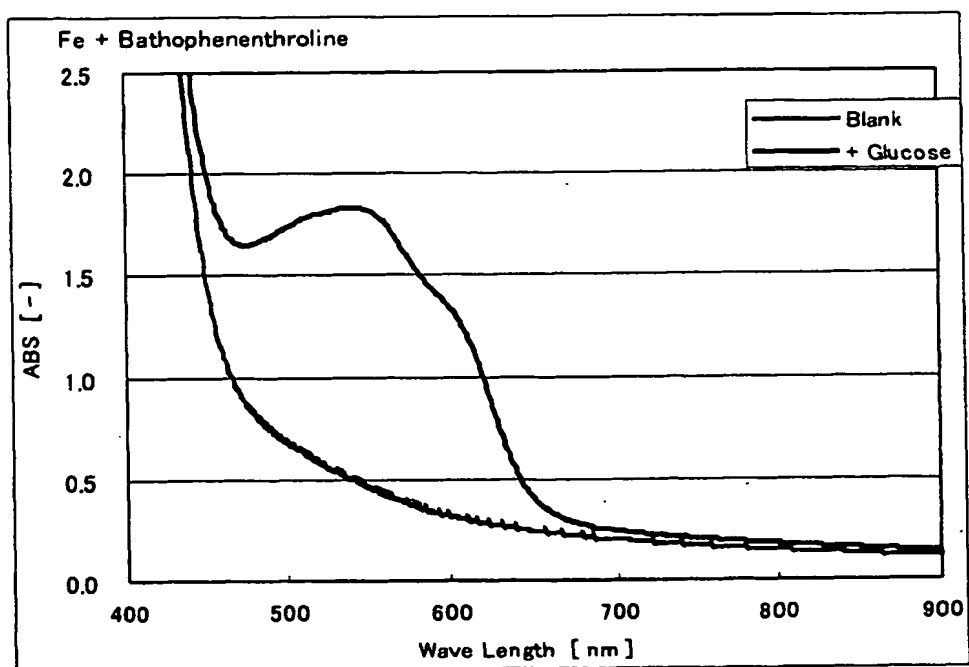


Fig.7A

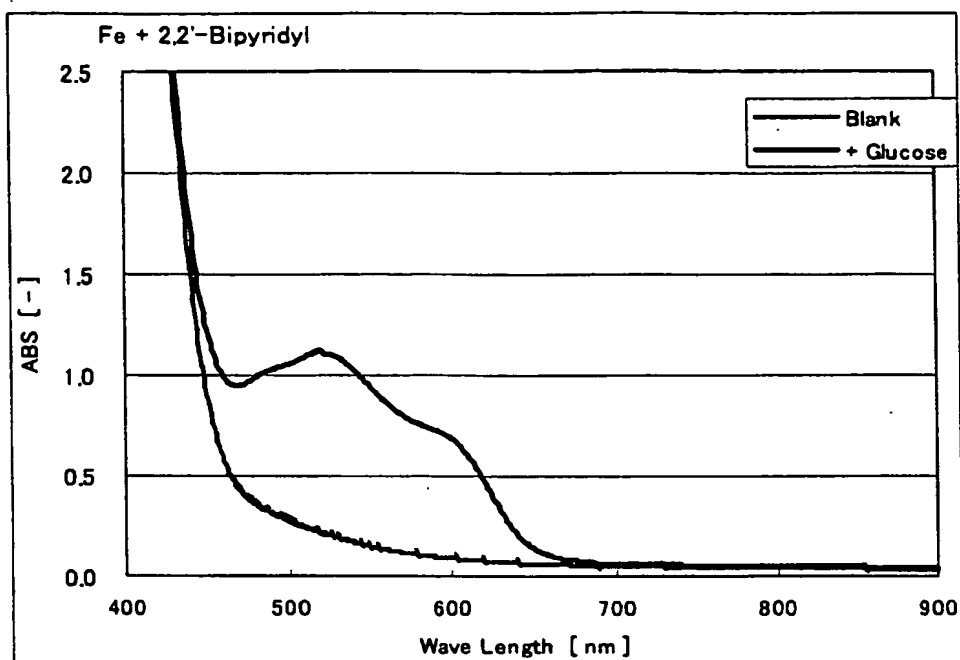


Fig.7B

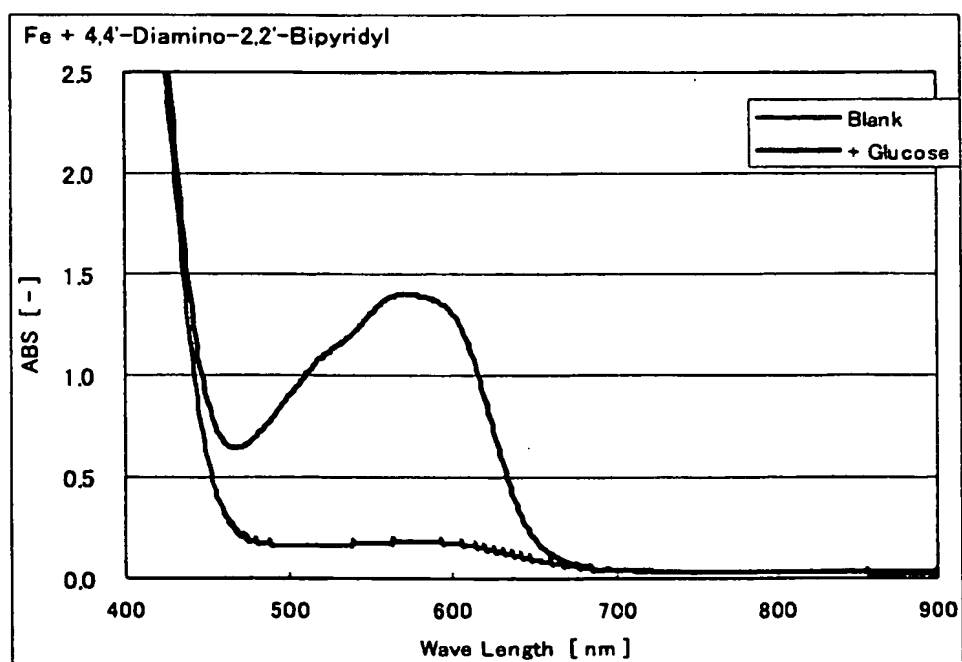


Fig.8

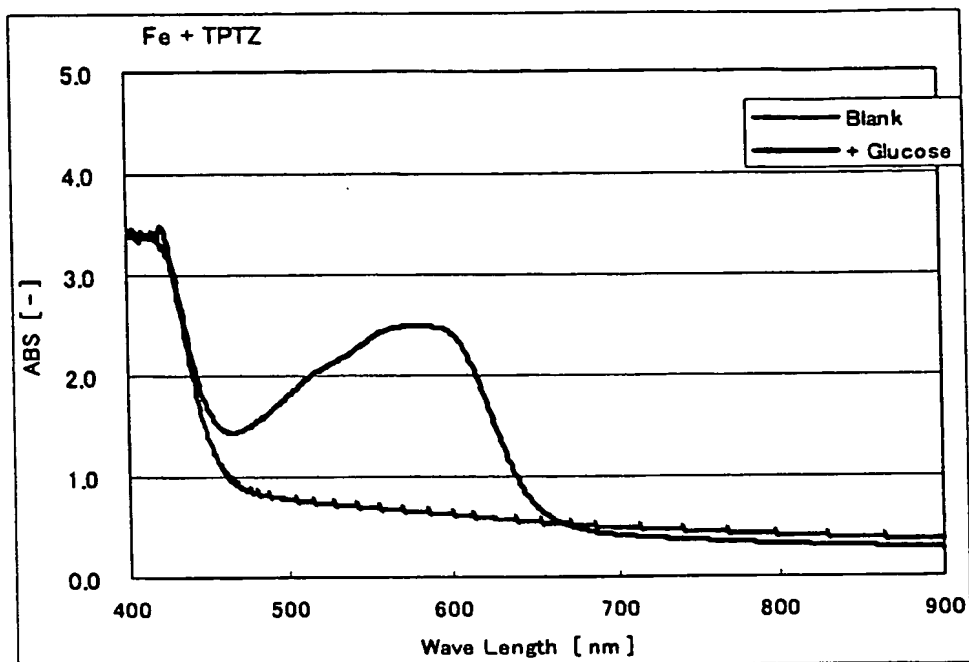


Fig.9

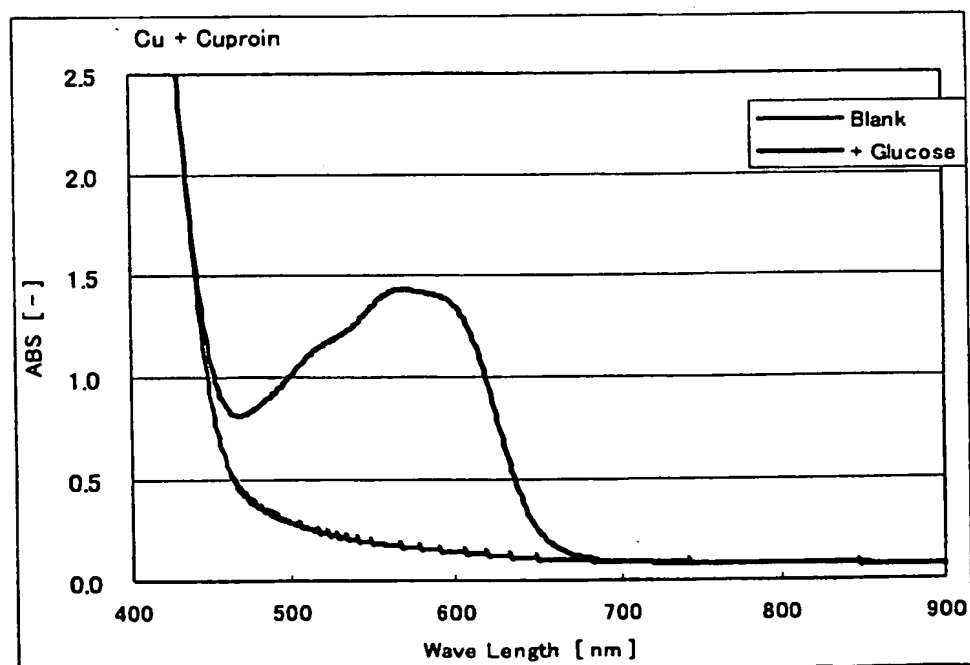


Fig.10

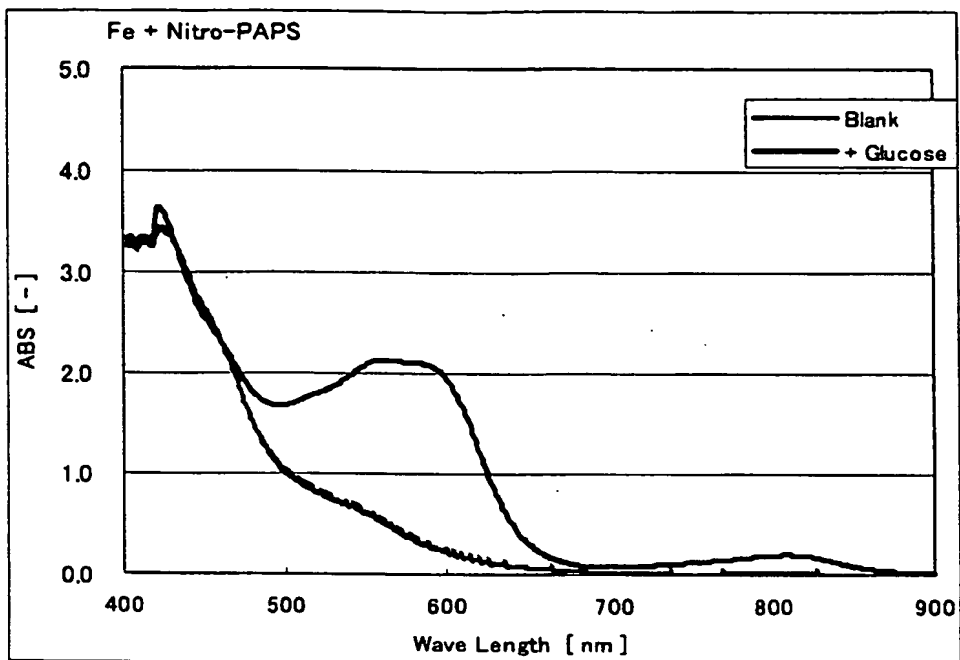


Fig.11

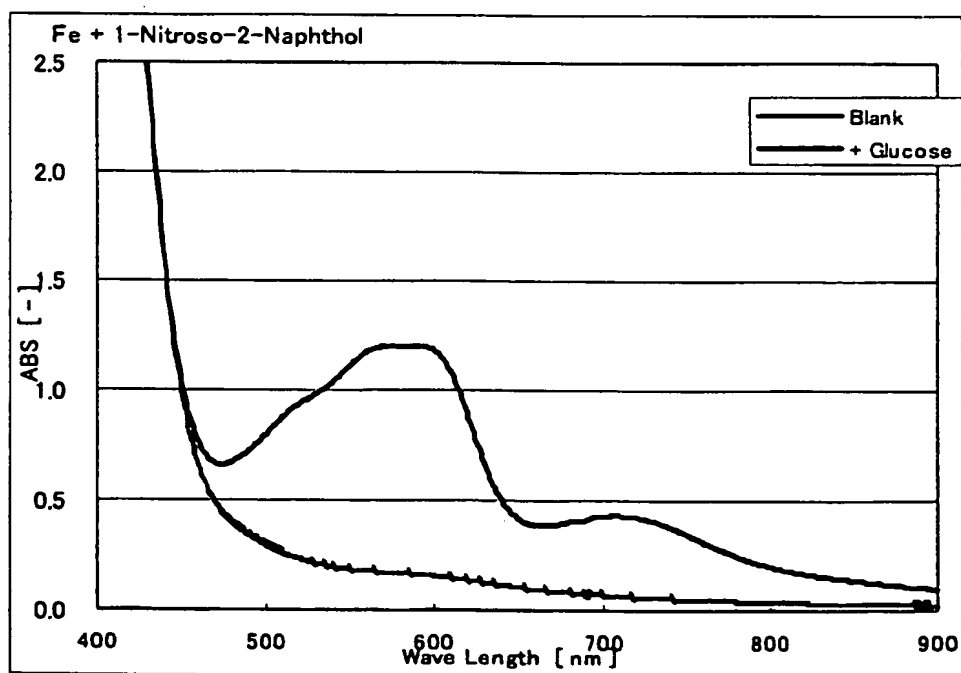


Fig.12

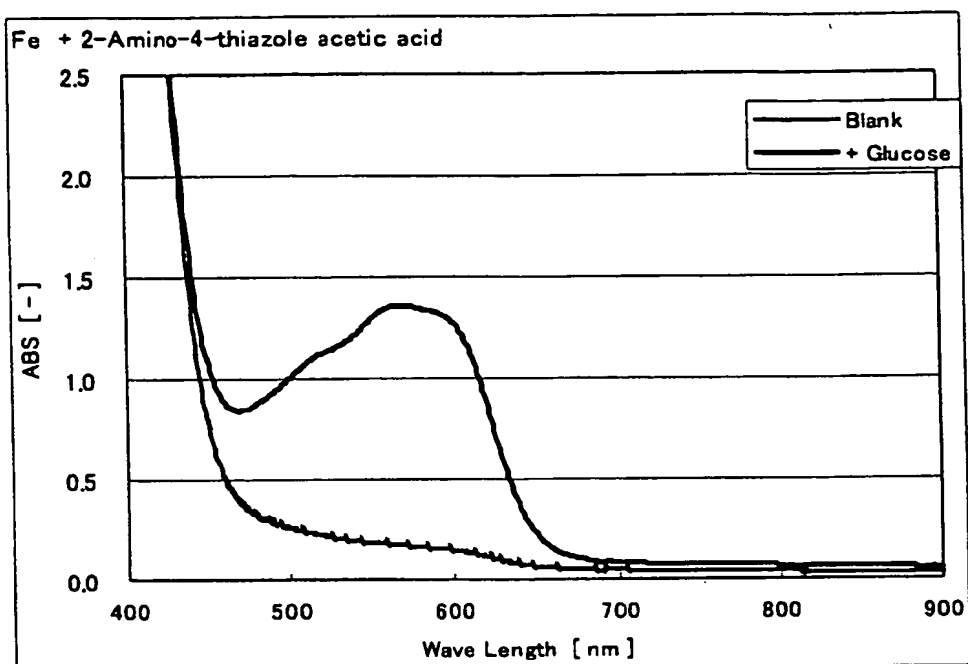


Fig.13

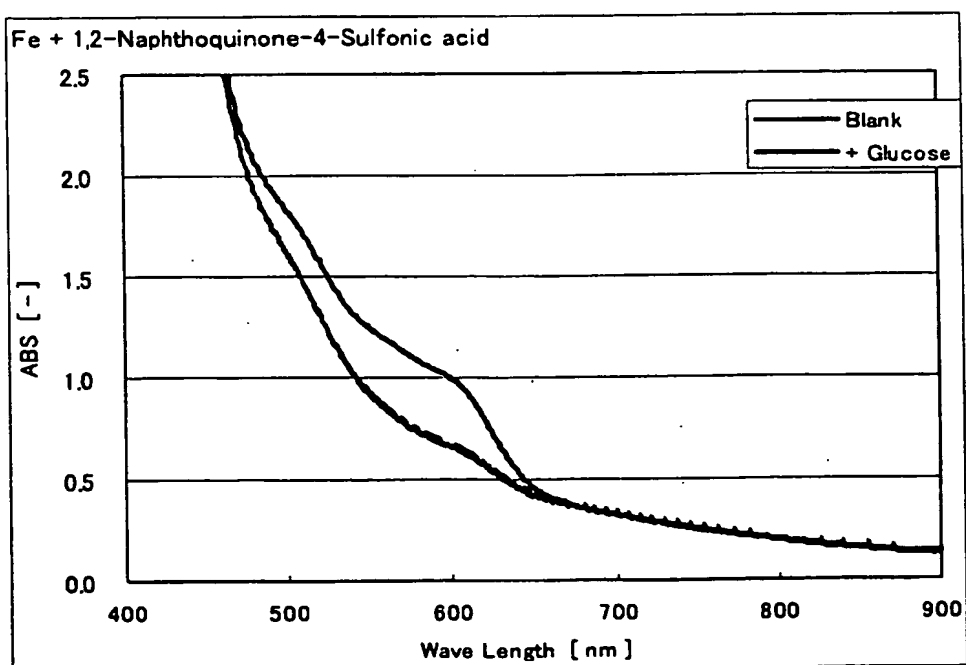


Fig.14A

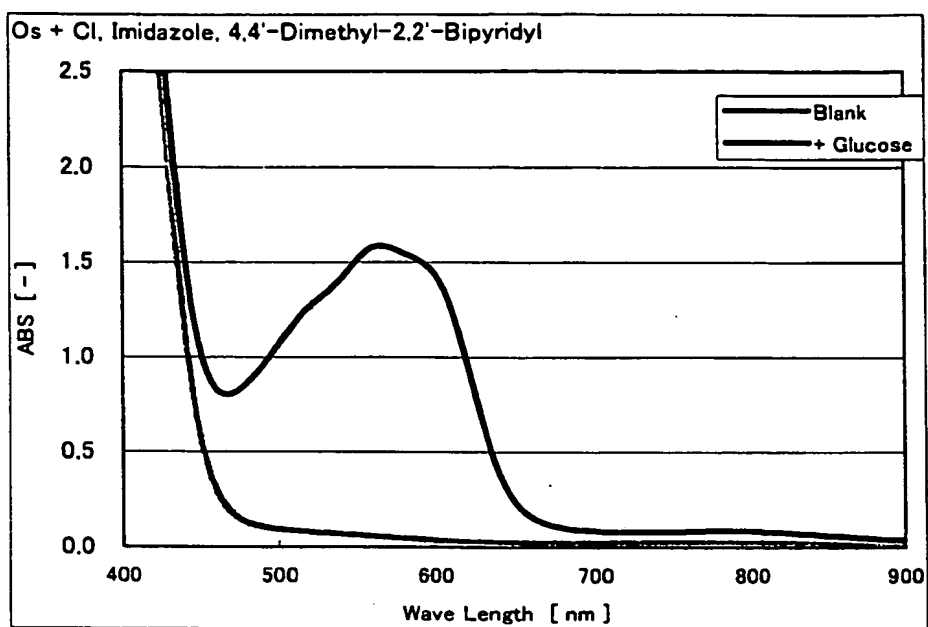


Fig.14B

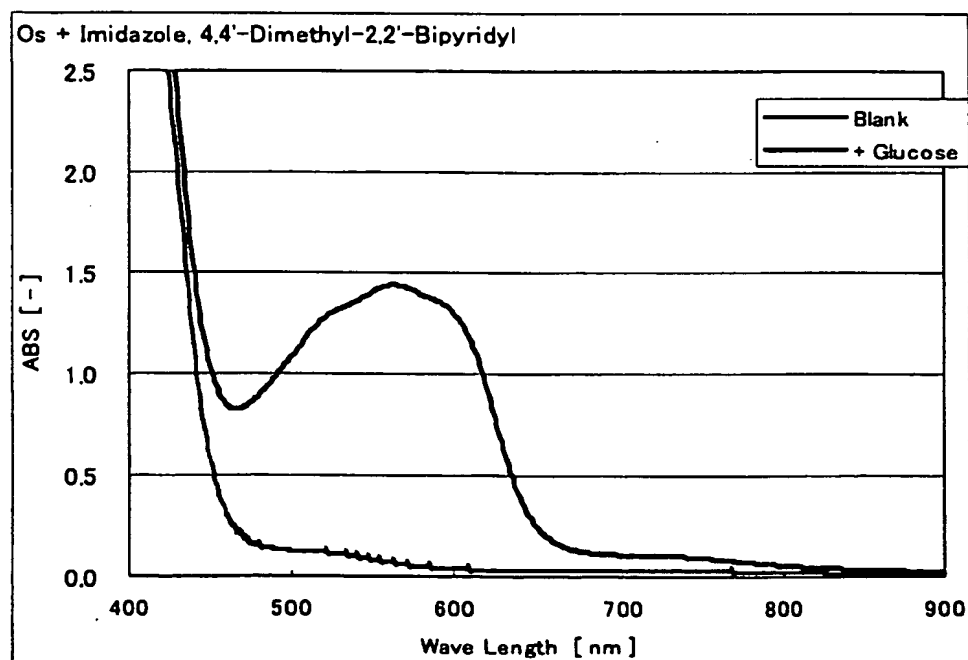


Fig.15

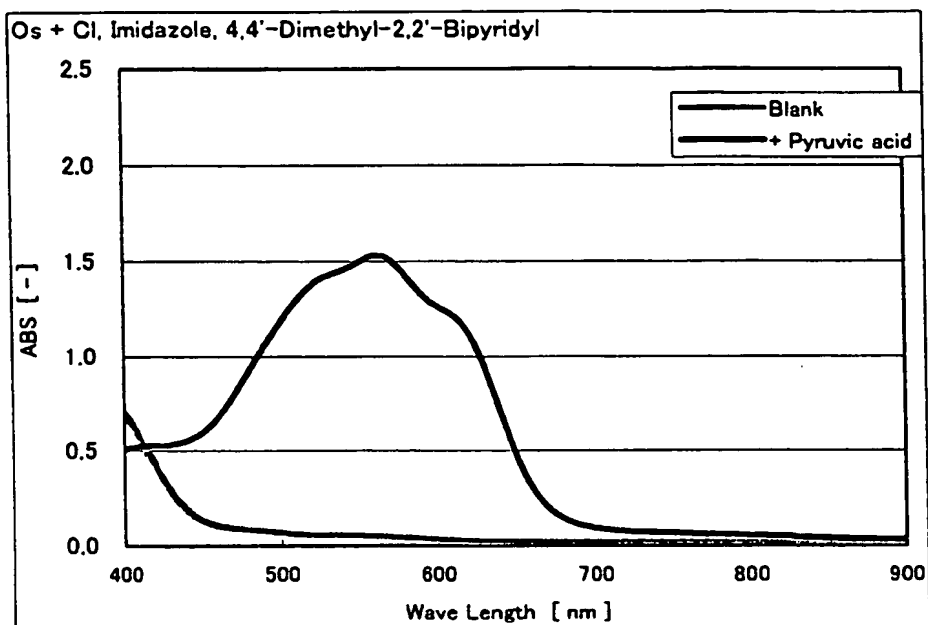


Fig.16A

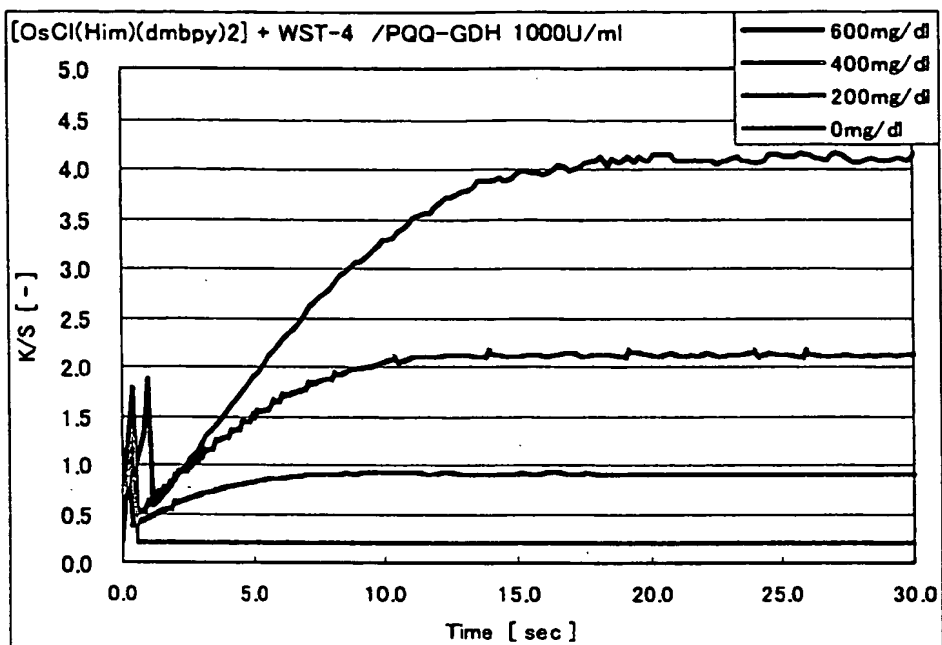
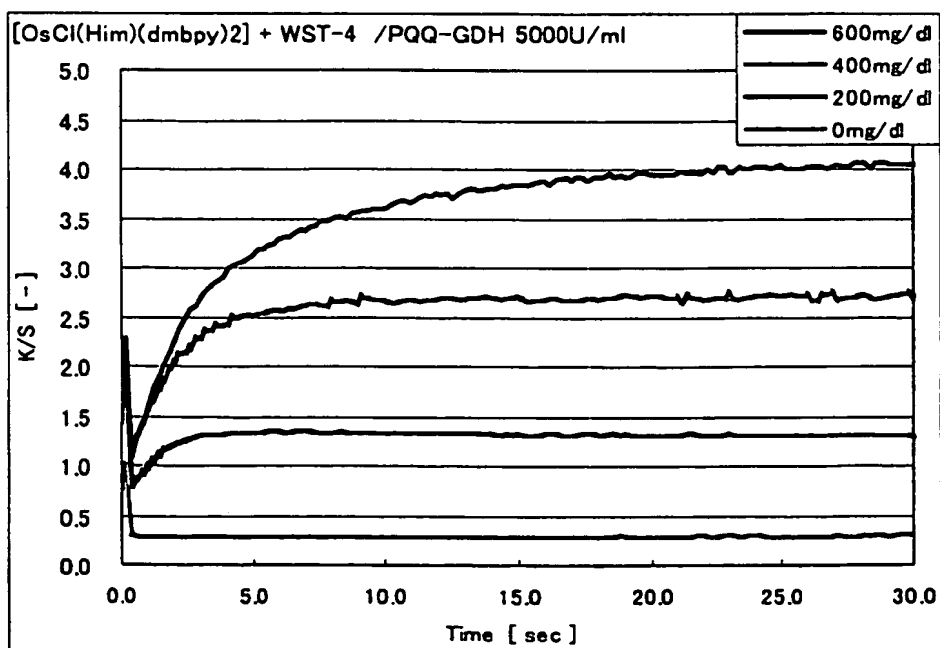


Fig.16B





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00027

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/32, G01N21/78, G01N31/22, G01N33/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/32, G01N21/78, G01N31/22, G01N33/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 100217 A (WAKO PURE CHEM IND LTD.), 08 February, 1984 (08.02.84), & US 4695539 A & US 4695540 A & JP 60-002198 A	1-24
A	WO 96/25514 A1 (Boehringer Mannheim Corp.), 22 August, 1996 (22.08.96), & EP 813608 A1 & JP 11-501209 A	1-24
A	EP 602488 A1 (ASULAB SA), 22 June, 1994 (22.06.94), & US 5410059 A & JP 06-263781 A	1-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 February, 2003 (27.02.03)

Date of mailing of the international search report  
11 March, 2003 (11.03.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/00027

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12Q 1/32, G01N 21/78, G01N 31/22, G01N 33/52

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12Q 1/32, G01N 21/78, G01N 31/22, G01N 33/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 100217 A (WAKO PURE CHEM IND LTD) 1984.02.08 & US 4695539 A & US 4695540 A & JP 60-002198 A	1-24
A	WO 96/25514 A1 (Boehringer Mannheim corp) 1996.08.22 & EP 813608 A1 & JP 11-501209 A	1-24
A	EP 602488 A1 (ASULAB SA) 1994.06.22 & US 5410059 A & JP 06-263781 A	1-24

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.02.03

国際調査報告の発送日

11.03.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448